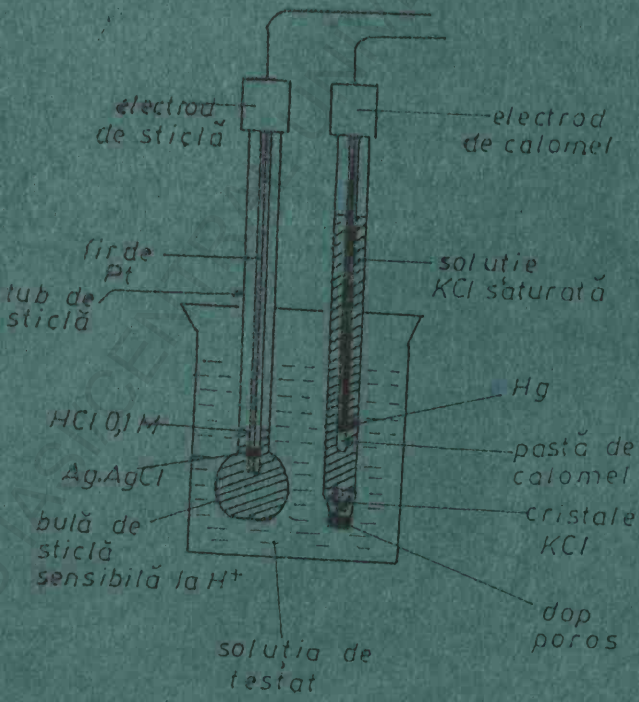
UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE, GEOGRAFIE ȘI GEOLOGIE

Lector dr. DANA IORDĂCHESCU ● Prof. dr. doc. șt. I. F. DUMITRU

BIOCHIMIE PRACTICĂ

EDIȚIA A 2-a REVĂZUTĂ ȘI COMPLETATĂ



H1 - 0241

BUCUREȘTI
– 1988 –

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8-8

UNIVERSITATEA DIN BUCUREŞTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE, GEOGRAFIE ŞI GEOLOGIE

Lector dr. DANA IORDĂCHESCU ● Prof. dr. doc. şt. I. F. DUMITRU

BIOCHIMIE PRACTICĂ

EDIŢIA A 2-a REVĂZUTĂ ŞI COMPLETATĂ

149552
B.C.U. - IASI

BUCUREŞTI
– 1988 –

22 IUL 1988

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 45.779
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
T. III - 9241

577.1 [076.5]

Biochimie [Lucrări practice]
Lucrări practice [Biochimie]

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

CUVÎNT ÎNAINTE 9

Reguli generale privind conduita în laboratorul de biochimie 10

CAPITOLUL I

Procedee de mojarare şi extracţie

1.1. Metode de dezintegrare a ţesuturilor 14
1.1.1. Dezintegrarea ţesuturilor prin mojarare 14
1.1.2. Dezintegrarea ţesuturilor cu omogenizatoare Potter-Elvehjem . . 14
1.1.3. Dezintegrarea ţesuturilor cu omogenizatoare cu cuţite 15
1.1.4. Alte metode de dezintegrare a ţesuturilor 15
1.2. Mediul de extracţie 16
1.3. Raportul de extracţie 17
1.4. pH şi temperatura extracţiei 17
Experienţa 1. Determinarea mediului optim de extracţie 18

CAPITOLUL II

Aminoacizi şi peptide

Experienţa 2. Proprietăţile generale ale aminoacizilor 21
Experienţa 3. Spectrul în UV al unor aminoacizi 27
Experienţa 4. Titrarea potenţiometrică a aminoacizilor 29
Experienţa 5. Dozarea aminoacizilor cu ninhidrină 30
Experienţa 6. Titrarea aminoacizilor cu formol 31
Experienţa 7. Dozarea tirozinei 32
Experienţa 8. Dozarea triptofanului 33
Experienţa 9. Dozarea compuşilor imidazolici 34
Experienţa 10. Cromatografia pe hîrtie 35
Experienţa 11. Cromatografia în strat subţire 44
Experienţa 12. Separarea aminoacizilor pe schimbători de ioni 46
Experienţa 13. Separarea aminoacizilor prin electroforeză 46

CAPITOLUL III

Metode de separare şi fracţionare a extractelor proteice

3.1. Dializa 49
Experienţa 14. Trecerea moleculelor printr-un sac de dializă 52
3.2. Fracţionarea proteinelor din extractele proteice totale prin precipitări cu sulfat de amoniu 52

Experiența 15. Solubilitatea proteinelor în apă distilată și în soluții saline . . 54
Experiența 16. Fracționarea proteinelor dintr-un extract prin precipitări cu sulfat de amoniu 55
3.3. Fracționarea proteinelor din extractele proteice totale prin precipitări cu solvenți organici 57
Experiența 17. Fracționarea proteinelor dintr-un extract prin precipitări cu acetonă 59
3.4. Fracționarea proteinelor dintr-un extract prin precipitare izoelectrică . 60
Experiența 18. Izolarea cazeinei din lapte 62
3.5. Fracționarea proteinelor prin termoprecipitare 62
Experiența 19. Determinarea procentuală a proteinelor denaturate la 60°C . 62
3.6. Fracționarea proteinelor prin precipitare cu săruri ale metalelor grele . . 63
Experiența 20. Precipitarea proteinelor cu cationi ai metalelor grele . . . 63
3.7. Precipitarea cu reactivi acizi 64
Experiența 21. Precipitarea unor proteine cu anioni complecși 64
3.8. Cromatografia de adsorbție 66
Experiența 22. Purificarea lactat dehidrogenazei 67
3.9. Gel cromatografia 72
Experiența 23. Desalefierea soluțiilor proteice pe coloane de Sephadex G-25 . 75
Experiența 24. Concentrarea soluțiilor proteice cu Sephadex 75
Experiența 25. Fracționarea proteinelor serice prin gel cromatografie . . . 76
3.10. Cromatografia prin schimb ionic 84
Experiența 26. Separarea cromatografică a proteinelor pe DEAE-celuloză . 85
Experiența 27. Separarea cromatografică a proteinelor pe CM-celuloză . . 86
Experiența 28. Separarea cromatografică a proteinelor pe fosfo-celuloză . . 87
Experiența 29. Separarea cromatografică a proteinelor pe DEAE-Sephadex . 88
Experiența 30. Prepararea γ-globulinei cu DEAE-Sephadex utilizînd tehnica „batch" 89
3.11. Electroforeza 90
3.11.1. Electroforeza în gel de poliacrilamidă 91
Experiența 31. Disc electroforeza 94
3.11.2. Electroforeza în gel de agar 94
Experiența 32. Separarea proteinelor pe gel de agar 96
3.11.3. Electroforeza pe hîrtie 96
Experiența 33. Separarea proteinelor serice prin electroforeză pe hîrtie . . 98
3.11.4. Electroforeza pe benzi de Cellogel 98
Experiența 34. Separarea proteinelor prin electroforeză pe benzi de Cellogel 98

CAPITOLUL IV

Metode de detectare a proteinelor și enzimelor separate electroforetic

4.1. Reacții de culoare pentru proteine 99
Experiența 35. Colorarea proteinelor cu Amido black 99
Experiența 36. Colorarea proteinelor cu fucsină acidă 100
Experiența 37. Colorarea proteinelor cu albastru de bromfenol 100
Experiența 38. Colorarea lipoproteinelor cu Sudan black 100
Experiența 39. Colorarea glicoproteinelor cu albastru de toluidină . . . 101
Experiența 40. Colorarea glicoproteinelor cu acid periodic-reactiv Schiff . . 101
Experiența 41. Evidențierea transferinelor 102
4.2. Reacții de culoare pentru enzime 103
Experiența 42. Evidențierea izoenzimelor lactat dehidrogenazei 103
Experiența 43. Evidențierea izoenzimelor peroxidazei din hrean 105
Experiența 44. Evidențierea izoenzimelor catalazei 106

Experiența 45. Evidențierea izoenzimelor amilazei 107
Experiența 46. Evidențierea izoenzimelor celulazei 107
Experiența 47. Evidențierea izoenzimelor fosfatazei alcaline 108
Experiența 48. Evidențierea izoenzimelor superoxid dismutazei 109

CAPITOLUL V

Metode de evidențiere și dozare a proteinelor

Experiența 49. Absorbția în ultraviolet a proteinelor 110
Experiența 50. Dozarea proteinelor prin metoda biuretului 112
Experiența 51. Hidroliza proteinelor 113
Experiența 52. Dozarea proteinelor prin metoda Lowry 113
Experiența 53. Determinarea azotului prin metoda Kjeldahl 115
Experiența 54. Determinarea azotului prin metoda Nessler 117
Experiența 55. Dozarea proteinelor cu Amido Black, prin metoda descrisă de Fuhr și Hinz 118
Experiența 56. Determinarea hemoglobinei prin metoda descrisă de Cohen și Smith 119
Experiența 57. Determinarea hemoglobinei cu reactiv Drabkin 119
Experiența 58. Standardizarea hemoglobinei 120
Experiența 59. Dozarea proteinelor din plasmă și ser 121
Experiența 60. Detectarea modificărilor conformaționale ale albuminei serice bovine prin măsurători de vîscozitate 122
Experiența 61. Efectul pH asupra conformației albuminei serice bovine . . 124

CAPITOLUL VI

Metode de analiză enzimatică

6.1. Determinarea activității enzimatice 126
Experiența 62. Dozarea activității alcool dehidrogenazei. Studiul mersului reacției în timp 127
Experiența 63. Dozarea activității lactat dehidrogenazei 128
6.2. Dozarea activității peroxidazei 129
Experiența 64. Dozarea activității peroxidazei din hrean după metoda Brad și colab. 130
Experiența 65. Dozarea activității lactoperoxidazei 131
6.3. Dozarea activității superoxid dismutazei 132
Experiența 66. Dozarea activității superoxid dismutazei 133
6.4. Dozarea activității catalazei 133
Experiența 67. Metoda colorimetrică descrisă de Sinha 135
Experiența 68. Metoda spectrofotometrică descrisă de Beers și Sizer . . . 136
6.5. Dozarea activității glucozoxidazei 137
Experiența 69. Dozarea activității glucozoxidazei prin metoda Banton modificată de noi 138
6.6. Dozarea activității succinat dehidrogenazei 140
Experiența 70. Determinarea colorimetrică a succinat dehidrogenazei cu clorură de trifeniltetrazoliu, după Kun și Abood 140
6.7. Dozarea L-aminoacid oxidazei 142
Experiența 71. Dozarea activității L-aminoacid oxidazei prin metoda lui Messey și Curti 142
6.8. Dozarea malat dehidrogenazei 143
Experiența 72. Dozarea activității malat dehidrogenezei din extracte tisulare 143
6.9. Dozarea activității fosforilazei a și b 144
Experiența 73. Dozarea activității fosforilazei prin metoda lui Cori și Illingworth 145

6.10. Dozarea activității glutamat oxaloacetat transaminazei (GOT) 147
Experiența 74. Determinarea activității GOT prin metoda lui Reitman și Frankel 147
Experiența 75. Determinarea activității GOT prin metoda lui Tonhazy și White . . 149
6.11. Dozarea activității glutamat piruvat transaminazei (GPT) 150
Experiența 76. Determinarea activității GPT prin metoda Reitman și Frankel 150
Experiența 77. Determinarea activității GPT din extracte tisulare printr-o metodă adaptată de noi 152
6.12. Dozarea activității ribonucleazei 154
Experiența 78. Dozarea activității RNazei pancreatice prin metoda spectrofotometrică 154
6.13. Dozarea activității lipazei 155
Experiența 79. Dozarea activității lipazei pancreatice după Willstätter . . 156
6.14. Dozarea fosfatazei alcaline 157
Experiența 80. Dozarea activității fosfatazei alcaline utilizînd β-glicerofosfatul ca substrat 157
Experiența 81. Dozarea activității fosfatazei alcaline utilizînd ca substrat p-nitrofenil fosfatul 159
Experiența 82. Dozarea activității fosfatazei alcaline utilizînd ca substrat fenil fosfatul 159
6.15. Dozarea fosfatazei acide 160
Experiența 83. Dozarea activității fosfatazei acide utilizînd ca substrat β-glicerofosfatul 160
Experiența 84. Dozarea activității fosfatazei acide utilizînd ca substrat p-nitrofenil fosfatul 161
6.16. Dozarea activității amilazei 162
Experiența 85. Dozarea activității α-amilazei, după metoda descrisă de Hostetler și colab. 163
Experiența 86. Determinarea activității α-amilazei cu substrate insolubile colorate 165
Experiența 87. Determinarea activității α-amilazei printr-o metodă adaptată de noi după Metais și Bieth 166
Experiența 88. Dozarea α-amilazei prin metoda Willstatter-Schudel . . . 167
6.17. Dozarea activităților enzimatice dintr-un sistem celulolitic 168
Experiența 89. Dozarea activității C_1 celulazice, după Peitersen 169
Experiența 90. Determinarea activității C_x celulazice, după Petterson și Porath 170
Experiența 91. Dozarea activității celobiazei 171
6.18. Dozarea activității pepsinei 172
Experiența 92. Dozarea activității pepsinei prin metoda Anson 172
6.19. Dozarea activității catepsinei B 175
Experiența 93. Determinarea activității catepsinei B după metoda lui Barrett 175
6.20. Dozarea activității tripsinei 177
Experiența 94. Dozarea activității tripsinei utilizînd ca substrat hemoglobina denaturată 177
6.21. Dozarea activității arginazei 178
Experiența 95. Dozarea activității arginazei prin metoda lui Eggleton și colab. 179
6.22. Dozarea activității invertazei 180
Experiența 96. Dozarea activității invertazei 180
6.23. Dozarea activității ureazei 182
Experiența 97. Determinarea activității ureazei cu reactiv Nessler . . . 182
6.24. Dozarea activității colinesterazelor 183
Experiența 98. Dozarea activității acetilcolinesterazei 184
6.25. Dozarea activității arilesterazelor 185

Experiența 99. Evidențierea și dozarea activității arilesterazei din bilă . . 185
6.26. Dozarea activității carboxipeptidazelor 187
Experiența 100. Dozarea carboxipeptidazei B cu hipuril-L-arginină ca substrat 187

CAPITOLUL VII

Zaharuri

7.1. Proprietățile generale ale zaharurilor 191
Experiența 101. Reacții de identificare a zaharurilor 192
7.2. Metode de dozare a zaharurilor 197
Experiența 102. Mutarotația zaharurilor 198
Experiența 103. Dozarea polarimetrică a zaharurilor 199
Experiența 104. Dozarea glucozei prin oxidare cu iod în condiții alcaline . 199
Experiența 105. Determinarea conținutului în zaharuri din portocale . . . 200
Experiența 106. Oxidarea cu periodat 201
Experiența 107. Dozarea spectrofotometrică a zaharurilor prin metoda Nelson 203
Experiența 108. Dozarea lactozei din lapte 204
Experiența 109. Dozarea spectrofotometrică a zaharurilor reducătoare prin metoda Somogyi Nelson 205
Experiența 110. Dozarea zaharurilor reducătoare prin metoda Park Johnson 206
Experiența 111. Diferențierea hexozelor în soluții prin reacția cu carbazol 207
Exprienta 112. Dozarea hexozelor totale prin reacția cu cisteină în mediu de acid sulfuric 208
Experiența 113. Dozarea manozei prin reacția cu cisteină în mediu de acid sulfuric 209
Experiența 114. Dozarea hexozelor totale cu antronă 209
Experiența 115. Dozarea zaharurilor reducătoare cu fenol-acid sulfuric . . 211
Experiența 116. Dozarea zaharurilor reducătoare cu o-toluidină 211
Experiența 117. Dozarea cetohexozelor prin metoda Roe 212
Experiența 118. Dozarea cetohexozelor cu reactiv cisteină carbazol . . . 213
Experiența 119. Dozarea pentozelor prin reacția Bial 214
Experiența 120. Dozarea pentozelor cu cisteină-H_2SO_4 214
Experiența 121. Dozarea acizilor uronici cu naftorezorcinol 215
Experiența 122. Dozarea acizilor uronici cu carbazol 216
Experiența 123. Dozarea enzimatică cu o-dianisidină 216
Experiența 124. Dozarea enzimatică a glucozei cu ABTS 217
Experiența 125. Dozarea enzimatică a galactozei 218
Experiența 126. Prepararea amidonului și fracțiunilor lui 219
Experiența 127. Izolarea glicogenului hepatic și dozarea lui 220
Experiența 128. Hidroliza acidă a glicogenului și a altor polizaharide . . 221
Experiența 129. Hidroliza enzimatică a glicogenului cu α- și β-amilază . . 222
Experiența 130. Scindarea glicogenului cu fosforilaza din mușchi și producerea de l-fosfat 223
7.3. Metode de separare a zaharurilor 224
Experiența 131. Separarea cromatografică a zaharurilor pe coloane cu cărbune 224
Experiența 132. Separarea zaharurilor prin cromatografie pe hîrtie . . . 225

CAPITOLUL VIII

Lipide

8.1. Purificarea solvenților utilizați în studiul lipidelor 238
8.2. Procedee de extracție a lipidelor 239
Experiența 133. Extracția lipidelor din țesuturile animale 240

Experiența 134. Extracția lipidelor din țesuturile vegetale 241
Experiența 135. Extracția lipidelor din microorganisme 241
Experiența 136. Extracția lipidelor din plasma sanguină sau din celulele sîngelui 242
8.3. Păstrarea extractelor lipidice 242
8.4. Proprietățile generale ale lipidelor 243
Experiența 137. Testarea proprietăților lipidelor 243
8.5. Metode de dozare și analiză a lipidelor 245
Experiența 138. Determinarea greutății uscate 245
Experiența 139. Dozarea fosforului total din fosfolipide 245
Experiența 140. Dozarea azotului aminic din lipide 246
Experiența 141. Dozarea zaharurilor totale din glicolipide 247
Experiența 142. Dozarea lipidelor totale din serul sanguin 247
Experiența 143. Determinarea echivalentului de neutralizare 248
Experiența 144. Determinarea indicelui de iod. Metoda Hübl 249
Experiența 145. Determinarea indicelui de saponificare 250
Experiența 146. Determinarea unor componente nesaponifiabile 251
Experiența 147. Dozarea colesterolului prin metoda Liebermann-Burchard . 252
Experiența 148. Dozarea colesterolului total și liber prin metoda Zlatkis . . 253
Experiența 149. Dozarea triacilglicerolilor 254
Experiența 150. Dozarea fosfatidilcolinei (lecitinei) 256
Experiența 151. Dozarea acizilor grași după oxidare cu dicromat-H_2SO_4 . . 257
Experiența 152. Dozarea acizilor grași liberi ca săruri de cupru 258
Experiența 153. Dozarea acizilor grași esterificați 259
Experiența 154. Dozarea colinei 260
Experiența 155. Dozarea glicerolului 261
Experiența 156. Dozarea vitaminei A 262
8.6. Metode de separare a lipidelor din amestecuri 262
Experiența 157. Fracționarea lipidelor din amestecuri prin precipitare cu acetonă 263
Experiența 158. Fracționarea lipidelor din amestecuri prin cromatografie de absorbție 264
Experiența 159. Cromatografia lipidelor pe coloane de Sephadex 265
Experiența 160. Cromatografierea lipidelor pe coloane de DEAE-celuloză . . . 266
Experiența 161. Cromatografierea lipidelor pe coloane de TEAE-celuloză . . 267
Experiența 162. Cromatografia în strat subțire a lipidelor 268
Experiența 163. Prepararea colesterolului din creier 272
Experiența 164. Prepararea lecitinei din ou 273
8.7. Studiul unor proprietăți a membranelor biologice 274
Experiența 165. Studiul permeabilității unui strat monomolecular lipidic . . 274
Experiența 166. Efectul detergenților asupra membranelor eritrocitare . . . 275

CAPITOLUL IX

Metode de determinare a pH și prepararea soluțiilor tampon

BIBLIOGRAFIE 286

BIBLIOTECA DE BIOLOGIE

CUVÎNT ÎNAINTE

Metodele, procedeele și tehnicile reunite în volumul de față reprezintă o parte din experiența Laboratorului de Enzimologie și văd lumina tiparului după o îndelungată verificare în cadrul lucrărilor practice de laborator efectuate cu studenții Secției de Biochimie de la Facultatea de Biologie Geografie-Geologie a Universității din București.

Adresîndu-se direct studenților, lucrarea poartă amprenta specifică procesului de instruire universitară: își propune (i) aprofundarea cunoștințelor teoretice dobîndite în cadrul prelegerilor de biochimie, al dezbaterilor și studiului individual și (ii) formarea unor reprezentări și deprinderi experimentale corecte despre modalitatea de abordare și rezolvare a unor probleme de strictă specialitate, prin îmbinarea cunoștințelor științifice fundamentale în cadrul experimentului biochimic, care el însuși comportă demersuri experimentale și interpretative specifice.

Din cauza spațiului tipografic limitat, pe de o parte și a convingerilor noastre că importanța biochimiei și a aplicațiilor ei practice în cele mai diferite domenii de activitate nu mai trebuie demonstrate, pe de altă parte — lucrarea conține un număr limitat de indicații privind domeniile de aplicare a metodelor expuse. Apreciem însă că ea cuprinde elementele fundamentale necesare orientării corecte a unui specialist, bine instruit teoretic și deprins cu particularitățile experimentului de biochimie, de a selecționa materialul biologic și metoda corespunzătoare scopului propus.

Cititorul nostru nu va găsi în această lucrare o serie de metode, procedee și tehnici curente care-l pot interesa. Ele fac obiectul părții a a II-a a acestei lucrări, care va apare într-un viitor apropiat.

REGULI GENERALE PRIVIND CONDUITA ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE

— Pipetele și sticlăria de laborator se spală cu amestec sulfo-cromic și se clătește cu apă de robinet și apoi cu apă distilată ;

— Pipetele spălate se așează cu vîrful în sus în containere curate, tapetate cu hîrtie de filtru ;

Reactivii preparați pentru lucrarea de laborator se păstrează în sticle speciale acoperite ; soluțiile de KOH și NaOH nu se țin în sticle cu dop rodat ; reactivii sensibili la lumină se păstrează în sticle brune și la întuneric ; preparatele enzimatice și soluțiile substratelor lor se țin în frigider ; în cazul reactivilor perisabili pe etichetă se indică data preparării acestora.

— Experimentele se execută cu cantități minime de reactivi ; odată scoși din sticla originală, reactivii nu se mai toarnă înpaoi ;

— Pentru prepararea soluțiilor, reactivii se scot din flacoanele originale cu spatule curate ;

— După cîntăriri, balanțele analitice se curăță cu pensula și se deconectează de la curentul electric ;

— După spectrofotometrări, cuvele de sticlă se spală rapid cu amestec oxidant și apoi se clătesc cu apă de robinet și cu apă distilată. Cuvele de cuarț nu se spală cu amestec oxidant existînd pericolul dezlipirii pereților acestora. Aparatele de măsurare se deconectează de la sursa de curent electric și se lasă în perfectă curățenie.

— După realizarea unei electroforeze, camerele electrod se spală cu detergent, clătindu-se ulterior cu apă de robinet și apă distilată. Soluția tampon nu se folosește mai mult de trei ori.

Pentru evitarea accidentelor de laborator :

— În eprubete, soluțiile se încălzesc numai sub agitare permanentă, evitînd direcționarea eprubetei spre persoane din apropiere ;

— Lichidele inflamabile sînt distilate și evaporate pe băi de nisip. Păstrarea și manipularea lor este interzisă în vecinătatea surselor de căldură ;

— Manipularea acizilor fumans sau a substanțelor gazoase toxice se realizează sub nișă ;

— La prepararea soluțiilor de acid sulfuric, acidul concentrat se toarnă peste apă și nu invers ;

— Sticlele cu acid sulfuric și cu alți reactivi cu densitate mare se țin de la bază, nu de gîtul ambalajului ;

— Soluțiile caustice, a unor substanțe otrăvitoare (KCN, azidă de sodiu) a unor extracte de la microorganisme patogene se pipetează automat sau cu pipete prevăzute cu pompe aspiratoare ;

— Este absolut interzis a folosi sticlăria de laborator pentru băut, mîncat, sau pentru păstrarea unor alimente ;

— Fumatul în laboratoare este interzis !

Primul ajutor în caz de accidente

— Dacă pielea este atinsă de acizi sau baze concentrate, se spală imediat sub jet puternic de apă. În cazul acidului sulfuric concentrat, mai întîi se îndepărtează principala cantitate prin ștergere (deoarece prin dezvoltare de căldură s-ar putea ca leziunile pielii să se accentueze) și apoi se spală cu multă apă ;

— Dacă soluțiile concentrate de acizi sau baze ajung în gură se recomandă, de asemenea, spălarea cu apă multă. Dacă acestea ajung în tubul digestiv este indicată folosirea unei soluții neutralizante (soluție MgO 5% și respectiv soluție CH_3COOH 1%). Este contraindicată folosirea soluțiilor de carbonați sau hidroxizi, chiar foarte diluate ;

— În cazul arsurilor la ochi cu acizi sau baze, se recomandă spălarea globului ocular cu apă distilată dintr-o pisetă, apoi cu soluție 1% de $NaHCO_3$ (în cazul arsurilor cu acizi) și respectiv cu soluție 1% de acid boric, în cazul arsurilor cu baze. Ochiul lezat se acoperă cu un pansament steril și imediat accidentatul este dus la un cabinet oftalmologic ;

— În cazul accidentării cu bucăți de sticlă, ochiul se acoperă cu o compresă sterilă umedă pentru a opri mișcările globului ocular și accidentatul este transportat urgent la un cabinet oftalmologic ;

— Arsurile pe membre sînt bandajate (nu se spală cu apă !) și accidentatul este transportat la o clinică de specialitate ;

— În caz de otrăvire, se administrează accidentatului cantități mari de lapte și apoi vomitive, după care este trimis la un cabinet medical ;

— Rănile produse prin tăiere se curăță de corpuri străine și se pansează cu comprese sterile ;

— Fiecare accident de laborator, oricît de mic, trebuie anunțat cadrului didactic care conduce lucrarea de laborator !

CAPITOLUL I

PROCEDEE DE MOJARARE ȘI EXTRACȚIE

Într-o celulă animală sau vegetală, proteinele există fie în structura unor organite intracelulare : nuclei, mitocondrii, lizozomi, peroxizomi, fie în compoziția unor structuri membranare, fie „solubile" în citoplasmă. Indiferent de localizarea intracelulară a proteinelor, ele apar în inter-relații complexe cu alte biomolecule : acizi nucleici, glucide, lipide sau chiar cu alte proteine, formînd agregate supramoleculare, stabilizate prin interacții fizice sau chimice. Aceste agregate sînt, în general, insolubile în apă sau în soluții saline diluate. Solubilizarea unei anumite proteine dintr-un astfel de agregat supramolecular presupune în primul rînd ruperea tuturor celulelor, eliberarea în mediu, a conținutului lor, dispersarea mecanică, disocierea în componentele moleculare prin ruperea forțelor fizice și chiar a celor chimice (de tip electrostatic și de tip covalent).

Înainte de a proceda la extragerea unei anumite proteine dintr-un țesut trebuie cunoscuți anumiți factori :

— țesutul respectiv trebuie să conțină într-o cantitate suficient de mare proteina luată în studiu, pentru a fi rentabilă și posibilă separarea ei ;

— trebuie cunoscută localizarea intracelulară a proteinei care urmează a fi izolată.

În acest sens este normal a izola hemoglobina din sînge, mioglobina din mușchiul roșu, pepsina din sucul gastric și din mucoasă stomacală, enzimele digestive (amilaza, lipaza, tripsina) din pancreas etc.

În cazul particular în care țesutul hepatic este sursa biologică de separare a unei anumite proteine, se recomandă ca animalul să fie ținut înfometat timp de 24 ore înainte de sacrificare pentru a reduce cantitatea de glicogen care se acumulează în acest țesut și care poate împiedica extracția proteinei. Perfuzia organelor animale este un procedeu recomandabil pentru îndepărtarea sîngelui din țesuturile respective. Uneori se recomandă îndepărtarea manuală a grăsimilor și țesutului conjunctiv care datorită insolubilității lor îngreuiază extracția unei anumite proteine.

Organul trebuie colectat și utilizat imediat după sacrificarea animalului, deoarece post-mortem apar mari modificări, în special la nivelul activității unor enzime (autoliză). Acestea pot fi cel puțin parțial pre-

venite prin înghețarea rapidă a țesutului cu zăpadă carbonică sau în azot lichid. În unele cazuri particulare se recomandă păstrarea țesuturilor la —15°C în soluții de glicerol 40%—50%.

Izolarea proteinelor vegetale necesită îndepărtarea prealabilă a pigmenților asimilatori care pot împiedica dozările fizico-chimice în domeniul vizibil al spectrului. Dezintegrarea țesuturilor tari și rigide ale semințelor se realizează fie prin înmuierea peste noapte în soluții apoase, fie prin mojararea lor (în prezența sau în absența acetonei) pînă la obținerea unei pulberi fine.

Cunoașterea repartiției intracelulare a proteinelor pe care dorim să le izolăm influențează mult modul de solubilizare a lor. De exemplu, proteinele din interiorul organitelor intracelulare sau cele adsorbite pe diferite sisteme membranare sînt solubilizate mai greu numai după distrugerea integrității organitelor și respectiv prin ruperea forțelor fizico-chimice care le țin absorbite.

1.1. METODE DE DEZINTEGRARE A ȚESUTURILOR

Prima etapă în prepararea unui extract proteic constă în ruperea membranelor celulare, în vederea eliberării în mediu a organitelor constituente, a membranelor și componentelor solubile. În literatura de specialitate, există o serie de metode de rupere a celulelor de diferite tipuri, însoțite mai mult sau mai puțin de deteriorarea fizică (datorită în special căldurii)sau biologică (datorită inactivării enzimelor) a componentelor eliberate.

1.1.1. Dezintegrarea țesuturilor prin mojarare

Acest procedeu este realizat practic în *mojare* de porțelan, în prezentă de nisip, alumină, pămînt de diatomee sau pulbere de sticlă. Utilizînd această metodă s-a realizat dezintegrarea bacteriilor, a țesutului muscular al cordului etc.

1.1.2. Dezintegrarea țesuturilor cu omogenizatoare Potter-Elvehjem

Acest omogenizator constă dintr-un pistil de sticlă sau plastic care pătrunde într-un tub (a cărui capacitate variază de la 5 ml la 50 ml) — jocul liber al celor două piese fiind de circa 0,2 mm (Figura 1.1.) —. Pistilul are un bulb cilindric ai cărui pereți exteriori sînt șlefuiți cu pudră de carborund. Capătul lui are cîteva bobițe care facilitează mojararea. Aparatul este înzestrat cu un motor care rotește pistilul cu viteze variabile, de aproximativ 1 000 r.p.m. Macerarea țesutului are loc în

spațiul mic dintre pistil și peretele tubului. În tub este suspendat țesutul, proaspăt sau înghețat, în mediul de extracție, corespunzător diluției de 1 g cu 10 ml. Pentru a evita încălzirea omogenatului, tubul este răcit într-o solă refrigeratoare.

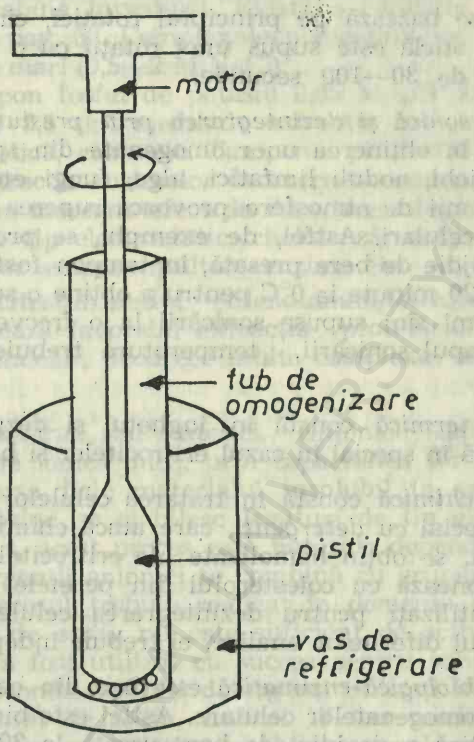


Figura 1.1. — Omogenizator Potter-Elvhjem

1.1.3. Dezintegrarea țesuturilor cu omogenizatoare cu cuțite

Cu ajutorul acestui tip de omogenizator, țesutul este dezintegrat rapid la 10 000—400 000 r.p.m., prin forțe de forfecare și tăiere, la un omogenat fin. Metoda nu este accesibilă fracționării subcelulare, deoarece organitele intracelulare, de exemplu, mitocondriile sînt distruse.

1.1.4. Alte metode de dezintegrare a țesuturilor

Omogenizatorul cu bile de sticlă este recomandat pentru țesuturile și celulele rezistente la tratamente mecanice, cum sînt bacteriile, drojdiile, tumorile ascitice etc. În prezența bilelor de sticlă, țesutul este dezintegrat prin vibrații mecanice, rotație sau agitare. Variind diametrul bilelor de sticlă și frecvența vibrației, rotația la agitare, este modificat gradul de omogenizare. Practic, în containere de oțel se introduc bile de sticlă duran (diametru 0,1 mm pentru bacterii și 0,5 mm pentru droj-

dii) spălate cu HNO_3 sau HCl diluat, apoi clătite cu apă distilată. Capsula de oțel este supusă unei agitări în direcție longitudinală cu o frecvență de aproximativ 90 c/s. Timpul de agitare pentru dezintegrarea celulelor tumorilor ascitice este de două ori cîte 5 secunde, iar pentru drojdii și bacterii — de două ori cîte 10 secunde. Alte omogenizatoare cu bile de sticlă se bazează pe principiul rotației, cînd containerul cu țesut și cu bile de sticlă este supus unei rotații cu o viteză de 2 000—4 000 r.p.m., timp de 30—100 secunde.

Omogenizarea sonică și dezintegrarea prin presiune este o metodă utilizată cu succes în obținerea unor omogenate din splină, celule ascitice, eritrocite, rinichi, noduli limfatici, alge, fungi etc. Modificările de presiune de cîteva mii de atmosfere provoacă ruperea sonică sau ultrasonică a pereților celulari. Astfel, de exemplu, se prepară o suspensie celulară 5% de drojdie de bere presată, în tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5. Se agită suspensia 20 minute la 0°C pentru a obține o suspensie de celule și porțiuni de 15 ml sînt supuse sonicării la o frecvență de 19,5 Kc/s 50 vați/cm^2. În timpul sonicării, temperatura trebuie menținută la —4—8°C.

Dezintegrarea termică constă în înghețul și dezghețul repetat al celulelor și se aplică în special în cazul eritrocitelor și bacteriilor.

Dezintegrarea chimică constă în tratarea celulelor cu diferiți reactivi chimici, în special cu *detergenți*, care atacă chimic pereții celulari. Astfel, de exemplu, se obțin hemolizate ale eritrocitelor, utilizînd *digitonina* care reacționează cu colesterolul din peretele celular. Deoarece reactivii chimici utilizați pentru dezintegrarea celulelor pot interfera ulterior pe parcursul diferitelor analize, ei trebuie îndepărtați din mediu.

Dezintegrarea biologică-enzimatică este una din cele mai vechi metode de obținere a omogenatelor celulare. Astfel este bine cunoscută descompunerea autolitică a drojdiei de bere uscată la 30°C, timp de 2—3 zile. Dezintegrarea lui *Micrococcus lysodeikticus* poate fi realizată cu suc pancreatic ,iar a țesutului muscular cu enzime proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*. Dezintegrarea biologică a *E. coli* poate fi realizată cu bacteriofagi.

1.2. MEDIUL DE EXTRACȚIE

Compoziția chimică a mediului de extracție influențează considerabil izolarea proteinei luate în studiu, menținerea funcției ei biologice, stabilitatea în timp a preparatului obținut etc.

Apa distilată este un mediu de extracție eficace pentru sistemele complexe care necesită adăugarea în amestecul de reacție a unor cofactori. Este un mediu hipotonic care realizează și distrugerea structurilor celulare.

Soluțiile saline izotonice de NaCl 0,15 M, KCl 0,15 M și zaharoză 0,25 M sînt mediile de extracție cel mai des utilizate în cercetările de biochimie deoarece ele realizează condiții similare celor existente *in vivo*.

Majoritatea proteinelor sînt solubilizate la concentrații mici de săruri neutre, manifestînd așa numitul efect de „salting-in" și sînt precipitate din soluție la concentrații mai mari din aceleași săruri, manifestînd așa numitul efect de „salting-out". Pentru fiecare proteină există un domeniu caracteristic al concentrațiilor saline, de solubilizare optimă și de precipitare, care trebuie investigat. Există o corelație între pH și concentrația sării (v. pag. 53. Complexele nucleoproteice pot fi disociate la concentrații saline mari (0,5—2 M NaCl).

Soluțiile tampon fosfat de potasiu 0,05 M, pH 7,4—7,8 și citrat de sodiu 0,02 M, pH 5,5 sînt medii de extracție optime pentru proteinele cu activitate catalitică, enzimele. Tamponul pirofosfat este, de asemenea, utilizat pentru extracția enzimelor deoarece tamponează într-un domeniu larg de pH, are un marcant efect de disociere a legăturilor de hidrogen și a legăturilor de tip electrostatic, chelatează mulți ioni bivalenți, are un efect protector asupra multor enzime etc.

Pirofosfatul, citratul, acidul etilendiaminotetraacetic și sărurile lui de sodiu influențează favorabil extracția proteinelor prin efectul lor de chelatare a metalelor, deoarece multe complexe metaloproteice sînt insolubile.

Detergenții naturali sau sintetici, cationici, anionici sau neionici, în condiții de tărie ionică mică, prin capacitatea lor de-a forma micele stabile pot dispersa fizic materialul insolubil în apă. Deoarece între detergenți și proteine se stabilesc legături de tip electrostatic și forțe van der Waals, acest proces este puternic dependent de pH. Astfel, de exemplu, detergenții anionici se combină cu grupările bazice ale proteinei și deci procesul trebuie realizat în domeniu neutru sau alcalin. Deși *deoxicolatul de sodiu* nu este suficient de activ pentru a disocia lipoproteinele, el a fost utilizat cu succes pentru solubilizarea în apă a unor enzime mitocondriale. Alți detergenți utilizați în solubilizarea proteinelor sînt: *colatul de sodiu*, *Lubrol W* (un condensat alcool cetilic-polioxietilen), *Tween* (polioxietilen sorbitan monolaurat), *digitonina*, etc.

Ureea și guanidina, HCl sînt reactivi chimici utilizați pentru disocierea multor complexe proteice, în special nucleoproteine, dar fiind agenți denaturanți prin acțiunea lor de rupere a legăturilor de hidrogen, nu pot fi folosiți pentru extracția enzimelor.

1.3. RAPORTUL DE EXTRACȚIE

De obicei 1 g țesut este omogenizat cu 10 ml mediu de extracție. Suspensii mai concentrate pot fi preparate, dar nu mai mult de 20%.

Raportul optim de extracție se determină experimental, fiind diferit în funcție de țesutul utilizat ca sursă biologică de extracție a proteinei date, de proprietățile fizico-chimice și biologice ale acesteia din urmă și de natura chimică a mediului de extracție.

1.4. pH ȘI TEMPERATURA EXTRACȚIEI

Alegerea pH la care se efectuează extracția este funcția de stabilitatea proteinei luate în studiu. Legăturile de tip electrostatic pot fi rupte prin ajustarea pH la valori cuprinse în domeniu 3—6. Deoarece punc-

tele izoelectrice ale majorității proteinelor sînt în domeniul acid (pH 4—6), acestea sînt mai solubile la valori de pH neutre și alcaline.

Procedeul de extracție se realizează deobicei la 0°C—4°C pentru a preveni termodenaturarea și autoliza.

Experiența 1. DETERMINAREA MEDIULUI OPTIM DE EXTRACȚIE

Se tatonează mediul optim de extracție a proteinelor totale din țesutul hepatic bovin, iar după alegerea acestuia se procedează la determinarea timpului optim de extracție.

Reactivi și soluții necesare

1. Zaharoză, soluție 0,25M;
2. $NaHCO_3$, soluție 0,001M;
3. NaCl, soluție 0,15M;
4. Dodecilsulfat de sodiu, soluție 0,1%;
5. Soluție tampon K_2HPO_4—KH_2PO_4 0,005M, pH 7,4.

Modul de lucru. Efectuăm șase omogenate, utilizînd un omogenizator cu cuțite (tip „waring blendor") prin macerarea a cîte 1 gram de țesut hepatic bovin cu cîte 10 ml din șase medii de extracție diferite: apa distilată, zaharoză — 0,25 M, $NaHCO_3$ — 0,001 M, NaCl — 0,14 M, dodecilsulfat de sodiu — 0,1% și soluție tampon de fosfați de potasiu, pH 7,4.

Imediat după efectuarea omogenizărilor se procedează la centrifugarea celor șase suspensii cu ajutorul unei centrifugi cu răcire, tip Janetzki (6000 r.p.m., timp de 15 minute, la —5°C). Sedimentele, care reprezintă celule intacte și debriuri celulare, sînt aruncate în timp ce supernatantele, care reprezintă extractele proteice totale se păstrează.

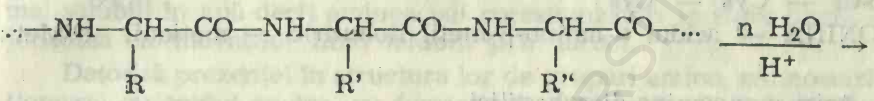
În fiecare supernatant se determină concentrația proteinelor utilizînd metoda spectrofotometrică (v. Experiența nr. 49). În calculul concentrației proteice, exprimată în mg/ml, se ține seama de factorul de diluție al preparatului proteic. Rezultatele experimentale sînt înglobate într-un grafic: mediu de extracție/mg/ml proteine solubilizate. Se comentează rezultatele și se alege mediul optim de extracție.

Se realizează trei noi omogenate din țesutul hepatic bovin și mediul de extracție optim (raport de extracție 1 gram cu 10 ml). Primul omogenat este centrifugat la 6 000 r.p.m, *imediat*, al doilea este centrifugat după o oră staționare la +4°C, iar al treilea, după *două ore* de extracție. În cele trei supernatante se dozează concentrația proteică prin aceeași metodă. Rezultatele experimentale obținute pot constitui un tabel: timp de extracție/mg/ml proteine solubilizate. Se comentează rezultatele.

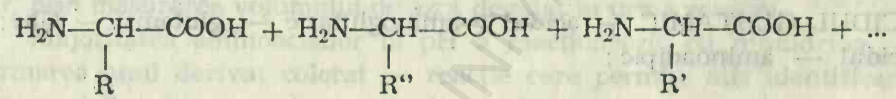
CAPITOLUL II

AMINOACIZI ŞI PEPTIDE

Cînd o proteină este tratată, timp de 24 ore, la 105°—110°C, cu o soluţie de HCl 6 N este hidrolizată cu formare de aminoacizi liberi. Proteinele sînt formate din numeroase resturi de aminoacizi, legate între ele prin legături peptidice :



fragment dintr-o proteină



formulele generale ale aminoacizilor rezultaţi după hidroliză

Proteinele sînt hidrolizate într-un mod similar şi la nivelul tubului digestiv sub acţiunea enzimelor proteolitice (pepsina, tripsina, chimotripsina, peptidazele), precum şi în cursul autolizei ţesuturilor. Aminoacizii rezultaţi în cursul digestiei sînt absorbiţi, trec în sînge şi pot contribui la biosinteza proteinelor endogene, pot fi transformaţi în hormoni de natură proteică sau derivaţi de la aminoacizi, în mediatori chimici, în amine biogene, în alcaloizi sau pot fi catabolizaţi şi eliminaţi sub formă de amoniac, uree, acid uric etc.

În funcţie de natura chimică a radicalului *R*, aminoacizi pot fi clasificaţi în *aminoacizi aciclici şi aminoacizi ciclici*. În continuare vor fi enumeraţi aminoacizii care se găsesc frecvent în structura proteinelor (scrişi cu litere majuscule) şi aminoacizii care se întîlnesc în organismele vii în stare liberă (scrişi cu litere mici) indicînd atît denumirea biochimică admisă cît şi denumirea chimică, nomenclatura restului incorporat în proteine şi simbolul lui.

a. Aminoacizi aciclici

1. Acizi monoamino monocarboxilici

GLICOCOL sau GLICINA — acidul α-aminoacetic—glicil—Gly ;
ALANINA — acidul α-aminopropionic — alanil — Ala ;
Acidul α-aminobutiric ;

Acidul γ-aminobutiric ;
Acidul β-amino-izobutiric ;
VALINA — acidul α-amino-izovalerianic — valil — Val ;
LEUCINA — acidul α-amino-izocapronic — leucil — Leu ;
IZOLEUCINA — acidul α-amino-β-metil valerianic — izoleucil — Ile ;

2. Hidroxiaminoacizi

SERINA — acid α-amino-β-hidroxipropionic — seril — Ser ;
TREONINA — acidul α-amino-β-hidroxibutiric — treonil — Thr ;

3. Tioaminoacizi

CISTEINA acidul α-amino-β-tiopropionic — cistienil Cys ;
CISTINA — rezultată prin condensarea a două molecule de cisteină — cistil — Cys — Cys ;
METIONINA — acidul α-amino-β-metil tiobutiric — metionil — Met ;

4. Acizi monoamino dicarboxilici

ACIDUL ASPARTIC — acidul α-aminosuccinic — aspartil — Asp ;
ACIDUL GLUTAMIC — acidul α-aminoglutaric — glutamil — Glu ;
Acidul — aminoadipic ;

5. Amide ale acizilor monoamino dicarboxilici

ASPARAGINA — amida acidului aspartic — asparaginil — Asn ;
GLUTAMINA — amida acidului glutamic — glutaminil — Gln ;

6. Acizi diamino monocarboxilici

LIZINA — acidul α, ε-diaminocapronic — lizil Lys ;
HIDROXILIZINA — acidul, α, ε-diamino-δ-hidroxicapronic — hidroxilizil —Hyl ;
ARGININA — acidul α-amino-δ-guanidinovalerianic — arginil — Arg.
Ornitina — acidul α, δ-diaminovalerianic ;
Citrulina — acidul α-amino-δ-ureidovalerianic.

b. Aminoacizi ciclici

1. Aminoacizi aromatici

FENILALANINA — Acidul α-amino-β fenil propionic — fenilalanil-Phe ;
TIROZINA — acidul α-amino-β-p-hidroxifenil propionic — tirozil — Tyr ;
Unii dintre derivații aminoacizilor aromatici iodurați îndeplinesc și funcția de hormoni tiroidieni.

2. *Aminoacizi heterociclici*

PROLINA — acidul pirolidin-2-carboxilic — prolil — Pro ;
HIDROXIPROLINA — acidul pirolidin-4-hidroxi-2-carboxilic — hidroxiprolil — 4-Hyp ;
HISTIDINA — acidul α-amino-β-imidazolil-propionic — histidinil — Hys ;
TRIPTOFAN — acidul α-amino-β-indolil propionic — triptofanil — Trp.

Proprietățile generale ale amionacizilor

Aminoacizii sînt substanțe solubile în apă, însă gradul de solubilitate diferă de la un aminoacid la altul. Solubilitatea cea mai mică în apă o are cistina și tirozina, iar cea mai mare prolina și hidroxiprolina. Prolina este singurul aminoacid solubil în alcool, ceilalți aminoacizi dizolvîndu-se foarte greu în acest solvent organic. Clorhidrații aminoacizilor sînt mult mai solubili în apă decît aminoacizii corespunzători în stare liberă — majoritatea clorhidraților fiind solubili și în alcool.

Datorită prezenței în structura lor de grupări amino, aminoacizii reacționează cu acidul azotos, cu formare de azot molecular. Această reacție stă la baza metodei van Slyke de dozare a azotului aminic al aminoacizilor, prin măsurarea volumului de azot degajat în urma reacției.

Majoritatea aminoacizilor la pH 5 reacționează cu ninhidrina, cu formarea unui derivat colorat — reacție care permite atît identificarea aminoacizilor pe cromatograme, cît și dozarea lor cantitativă.

Aminoacizii dau reacții caracteristice, datorate naturii chimice a radicalilor R, care permit diferențierea lor pe cromatograme și care stau la baza unor metode sensibil ede dozare a lor din amestecuri.

Experiența 2. PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE AMINOACIZILOR

a. Testarea solubilității aminoacizilor

Reactivi și soluții

— aminoacizi : glicină, tirozină, acid glutamic, lizină
— soluții de HCl 0,2 M și 2 M ;
— etanol
— cloroform
— indicator roșu de metil

Modul de lucru

(i) se testează solubilitatea aminoacizilor în apă distilată și se controlează pH soluției sau suspensiei obținute ;

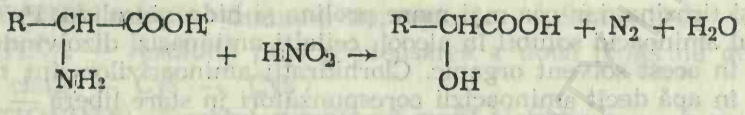
(ii) se testează solubilitatea aminoacizilor în soluții diluate de HCl, NaOH, în etanol și în cloroform ;

(iii) se urmărește precipitarea la pH izoelectric : se dizolvă 0,5 g aminoacid în 1 ml apă, se adaugă 2 picături de NaOH 2 M și o picătură de indicator. Se adaugă HCl, 0,2 M, picătură cu picătură, sub agitare constantă, pînă cînd indicatorul își modifică culoarea. Se repetă experiența, dizolvînd aminoacidul în apă, adăugînd 2 picături de HCl 2 M și o picătură de indicator. Utilizînd NaOH 0,2 M se ajustează pH.

Se comentează rezultatele.

b. Reacția cu acidul azotos

Această reacție poate fi utilizată și pentru dozarea cantitativă a aminoacizilor, prin măsurarea volumului de azot eliberat : un mol eliberează 22,4 litri de N_2. Această reacție stă la baza metodei Van Slyke, utilizată pentru determinarea azotului aminic.

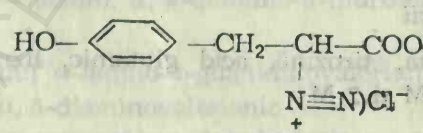


Reactivi și soluții

— aminoacizi : glicina, tirozina
— HCl 2 M
— $NaNO_2$ 10%

Modul de lucru

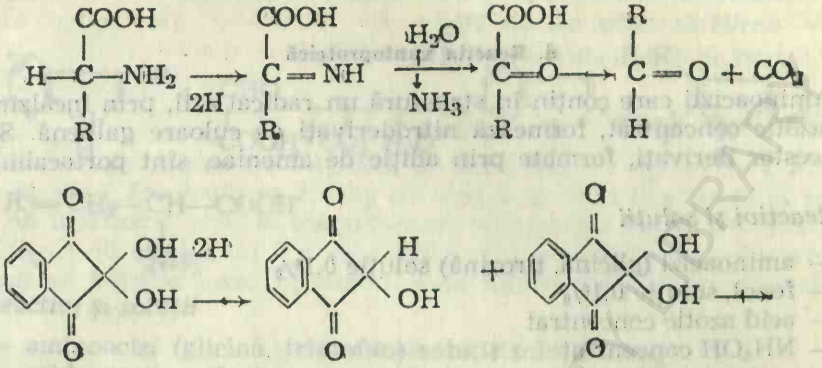
În două eprubete separate se dizolvă cîte 0,5 g glicină și respectiv 0,5g tirozină, în cîte 2 ml HCl 2 M. Într-o a treia eprubetă se pipetează numai 2 ml soluție HCl 2 M. Conținutul eprubetelor se răcește, după care se adaugă în fiecare cîte 1 ml $NaNO_2$ soluție 10% rece. Se compară și se comentează rezultatele. În cazul glicinei, un aminoacid alifatic, se constată o puternică eliberare de azot. În cazul tirozinei, într-o primă etapă se formează o sare de diazoniu, care prin încălzire se descompune în azot și în acid p-hidroxifenilen β-lactic.



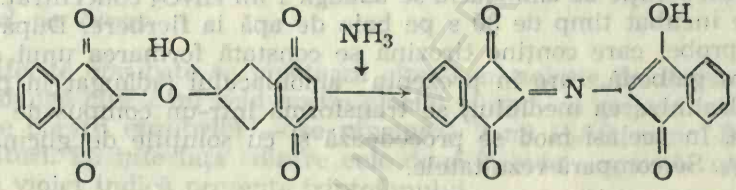
c. Reacția cu ninhidrină

Ninhidrina este un puternic agent oxidant, care reacționează cu toți α-aminoacizii, în domeniul de pH 4—8, cu formarea unor compuși colorați în albastru violet (purpura lui Ruhemann). Sub acțiunea oxidantă a ninhidrinei are loc dezaminarea și decarboxilarea aminoacidului, cu producerea unei grupări carbonil la α-atomul de carbon și eliberarea de CO_2 și de NH_3. În cursul reacției, aminoacidul este dezaminat oxidativ, trecînd prin stările intermediare de acid α-iminic și de acid α-cetonic, în timp

ce ninhidrina este redusă la hidrindantină, care condensează cu amoniacul eliberat cu formarea complexului colorat, denumit purpura lui Ruhemann :



Ninhidrina — Ninhidrina redusă — A doua moleculă de ninhidrină



Hidrindantina — Purpura lui Ruhemann

Reacția cu ninhidrină este pozitivă și pentru aminele primare și amoniac, dar decurge fără eliberare de CO_2. În cazul iminoacizilor — prolina și hidroxiprolina, în urma reacției cu ninhidrina se formează niște produși colorați în galben.

Reacția aminoacizilor cu ninhidrina este sensibilă și este frecvent utilizată pentru identificarea aminoacizilor, separați prin cromatografie de partiție pe hîrtie și pentru dozarea lor după eluție de pe coloane umplute cu schimbători de ioni.

Soluții

— aminoacizi, soluții preparate prin dizolvarea a 0,3 g în 2 ml tampon, pH 5 ;

— ninhidrină, soluție 0,2% în etanol.

Modul de lucru

Într-o serie de eprubete de pipetează cîte 2 ml soluție de aminoacid și 1 ml soluție de ninhidrină. Amestecul se incubează timp de 10 minute pe o baie de apă la fierbere.

Se vor nota culorile pe care diferiți aminoacizi le dau în urma reacției cu ninhidrina.

Se vor efectua diluții în serie, din soluția inițială de aminoacid, pentru testarea limitelor de sensibilitate ale reacției.

d. Reacția xantoproteică

Aminoacizii care conțin în structură un radical aril, prin încălzire cu acid azotic concentrat, formează nitroderivați de culoare galbenă. Sărurile acestor derivați, formate prin adiție de amoniac, sînt portocalii.

Reactivi și soluții

— aminoacizi (glicină, tirozină) soluție 0,1%
— fenol, soluție 0,1%
— acid azotic concentrat
— NH_4OH concentrat

Modul de lucru

La 1 ml soluție de aminoacid se adaugă 1 ml HNO_3 concentrat. Amestecul este incubat timp de 30 s pe baie de apă la fierbere. După răcire, în cazul probei care conține tirozină se constată formarea unui compus de culoare galbenă, care în prezența amoniacului (adăugat în picătură pînă la alcalinizarea mediului) se transformă într-un compus de culoare portocalie. În același mod se procedează și cu soluțiile de glicină și de fenol 0,1%. Se compară rezultatele.

e. Reacția Millon

Aminoacizii care conțin un radical hidroxibenzenic reacționează cu reactivul Millon formînd un complex de culoare roșie. Numai tirozina și derivații ei dau o reacție pozitivă.

Reactivul Millon original este o soluție de azotat mercuric 50% (v/v) în acid azotic. În această metodă este utilizat un reactiv Millon modificat: sulfat mercuric în acid sulfuric.

Soluții

— aminoacizi (glicină, tirozină) soluții 0,1%
— reactiv Millon ($HgSO_4$ 15% în acid sulfuric 15%)
— fenol 0,1%
— azotit de sodiu, soluție 1%

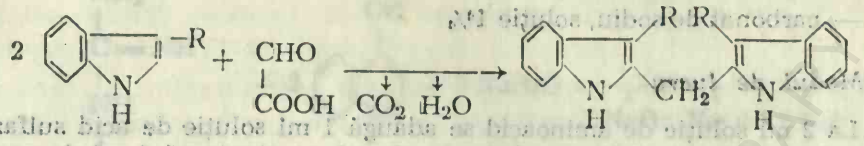
Modul de lucru

La 1 ml soluție de aminoacid se adaugă 5 picături de reactiv Millon și amestecul se incubează timp de 10 minute pe baie de apă în fierbere. Se răcește la temperatura camerii și se adaugă 5 picături de azotit de sodiu, soluție 1%. Reacția pozitivă se manifestă prin apariția unei colorații roșii.

Se repetă reacția cu 1 ml fenol 0,1%. Se comentează rezultatele.

f. Reacţia Hopkin-Cole

Gruparea indolil a triptofanului reacţionează cu acidul glioxilic în prezenţa acidului sulfuric concentrat, dînd un compus de culoare roşu-violet :



unde $R = CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$

Reactivi şi soluţii

— aminoacizi (glicină, triptofan) soluţii soluţii 0,1%

— acid acetic glacial care a fost expus la lumină (conţine acid glioxilic) ;

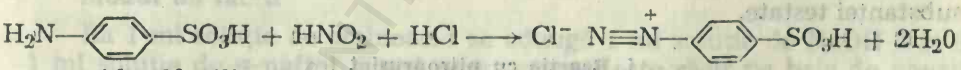
— acid sulfuric concentrat

Modul de lucru

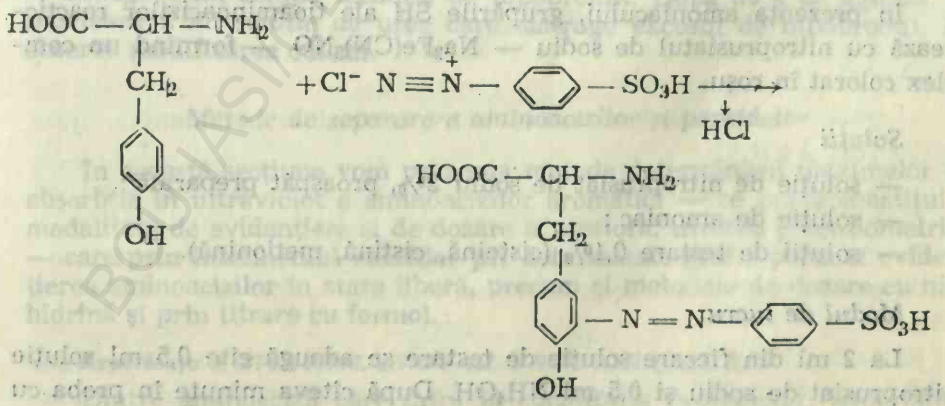
În diferite eprubete se pipetează cîte 2 ml soluţie de aminoacid, la care se adaugă cîte 2 ml acid acetic glacial şi apoi cu grije — prin prelingere pe pereţii eprubetei — se pipetează 2 ml H_2SO_4 conc. Se obţin două straturi. La interfaţa dintre cele două lichide, apariţia unui inel colorat în violet indică prezenţa triptofanului.

g. Reacţia Pauly

Sarea de diazoniu, formată prin diazotarea acidului sulfanilic, se cuplează cu amine, fenoli şi imidazoli dînd naştere unor coloranţi azoici :



acid sulfanilic — sare de diazoniu



colorant azoic

Soluții

— aminoacizi (glicină, tirozină) soluții 0,1%
— acid sulfanilic 1% preparat în HCl soluție 1 M
— azotit de sodiu, soluție 5%
— carbonat de sodiu, soluție 1%

Modul de lucru

La 2 ml soluție de aminoacid se adaugă 1 ml soluție de acid sulfanilic iar la amestecul răcit pe o baie de gheață se pipetează 1 ml de azotit de sodiu, 5%. După trei minute de staționare la rece, amestecul de reacție este adus la pH alcalin prin adăugarea a 2 ml soluție de Na_2CO_3. Se constată formarea colorantului azoic numai în cazul soluției de tirozină.

h. Reacția Ehrlich

În mediu puternic acid, p-dimetilaminobenzaldehida reacționează cu o serie de compuși organici (indoli, amine aromatice, ureide) formînd complexe colorate.

Soluții

— reactiv Ehrlich : 100 g p-dimetilaminobenzaldehidă se dizolvă în HCl conc. și se aduce la un volum final de 1 000 ml ;
— soluții de testare 0,1% (glicină, triptofan, hidroxiprolină și urec).

Modul de lucru

Într-o serie de eprubete se pipetează cîte 0,5 ml din fiecare soluție testată la care se adaugă 2 ml reactiv Ehrlich. În prezența substanțelor menționate apar complexe colorate în funcție de natura și concentrația substanței testate.

i. Reacția cu nitroprusiat

În prezența amoniacului, grupările SH ale tioaminoacizilor reacționează cu nitroprusiatul de sodiu — $Na_2Fe(CN)_5NO$ — formînd un complex colorat în roșu.

Soluții

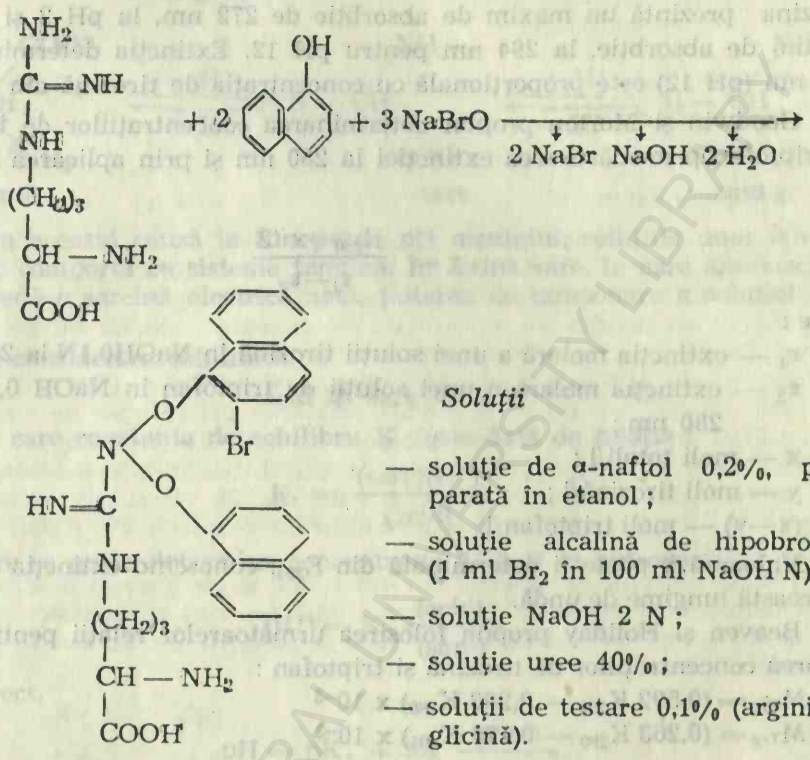
— soluție de nitroprusiat de sodiu 2%, proaspăt preparată ;
— soluție de amoniac ;
— soluții de testare 0,1% (cisteină, cistină, metionină).

Modul de lucru

La 2 ml din fiecare soluție de testare se adaugă cîte 0,5 ml soluție nitroprusiat de sodiu și 0,5 ml NH_4OH. După cîteva minute în proba cu soluția de cisteină apare o culoare roșie.

j. Testul Sakaguchi

În mediu alcalin, în prezența α-naftol și hipobromit, arginina și alți compuși cu grupări guanidilil formează complexe de culoare roșie.



Soluții

— soluție de α-naftol 0,2%, preparată în etanol;

— soluție alcalină de hipobromit (1 ml Br_2 în 100 ml NaOH N)

— soluție NaOH 2 N;

— soluție uree 40%;

— soluții de testare 0,1% (arginină, glicină).

Modul de lucru

La 1 ml soluție de aminoacid se adaugă 1 ml soluție de NaOH 2 N și 1 ml soluție de α-naftol. După ce amestecul este răcit pe baie de gheață se adaugă 1 ml soluție alcalină de hipobromit. După 30 s de agitare, se pipetează 1 ml soluție de uree care distruge excesul de hipobromit. Se observă modificarea culorii.

Metode de separare a aminoacizilor și peptidelor

În această secțiune vom prezenta metoda determinării maximelor de absorbție în ultraviolet a aminoacizilor aromatici — ce poate constitui o modalitate de evidențiere și de dozare a acestora, titrarea potențiometrică — care prin intermediul valorilor pK determinate grafic permite evidențierea aminoacizilor în stare liberă, precum și metodele de dozare cu ninhidrină și prin titrare cu formol.

Experiența 3. SPECTRUL ÎN UV AL UNOR AMINOACIZI

Dintre aminoacizii care intră în constituția proteinelor, triptofanul, tirozina și într-un grad mai mic fenilalanina, prezintă o absorbție carac-

teristică în ultraviolet. La pH 2, triptofanul prezintă un maxim de absorbție la 280 nm, iar fenilalanina — la 257 nm. pH soluției de aminoacid influențează valoarea maximului de absorbție. Astfel, de exemplu, tirozina prezintă un maxim de absorbție de 272 nm, la pH 2, și un alt maxim de absorbție, la 294 nm pentru pH 12. Extincția determinată la 294 nm (pH 12) este proporțională cu concentrația de tirozină din mediu.

Goodwin și Morton propun determinarea concentrațiilor de tirozină și triptofan prin măsurarea extincției la 280 nm și prin aplicarea formulei :

$$y = \frac{E_{280} - x \cdot \varepsilon_2}{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}$$

unde :

ε_1 — extincția molară a unei soluții tirozină în NaOH0,1N la 280 nm;

ε_2 — extincția molară a unei soluții de triptofan în NaOH 0,1 N la 280 nm ;

x — moli totali/l ;

y — moli tirozină/l ;

(x—y) — moli triptofan/l.

Valoarea x poate fi determinată din E_{294}, cunoscînd extincția molară la această lungime de undă.

Beaven și Holiday propun folosirea următoarelor relații pentru calcularea concentrațiilor de tirozină și triptofan :

$M_{Tyr} = (0{,}592\ K_{294} - 0{,}263\ K_{280}) \times 10^{-3}$

$M_{Trp} = (0{,}263\ K_{280} - 0{,}170\ K_{294}) \times 10^{-3}$

unde :

M_{Tyr} și M_{Trp} sînt μmoli de tirozină și de triptofand intr-un gram de proteină ;

K_{294} și K_{280} sînt coeficienții de extincție ai proteinei în soluție de NaOH 0,1 N la 284 nm și respectiv 280 nm.

Soluții

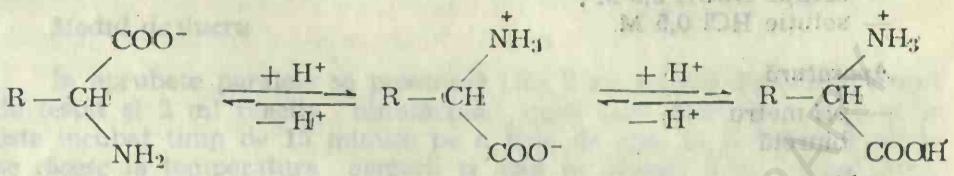
— soluții 1 x 10^{-4}M de tirozină, de triptofan și de fenilalanină, ajustate la pH și la pH 11.

Modul de lucru

Se citesc extincțiile soluției de aminoacid, la un pH anumit, față de apă, la un spectrofotometru, în domeniul 240 nm — 320 nm, la intervale de 5 nm.

Se trasează grafic spectrul aminoacidului în ultraviolet. Se notează modul în care pH influențează valoarea maximului de absorbție a unui anumit aminoacid.

Aminoacizii prezintă mai multe stări de ionizație datorită prezenței concomitente a unor grupări bazice și acide în structura lor :



bază sare acid

Din această cauză în funcție de pH mediului, soluțiile unor aminoacizi se comportă ca sisteme tampon. În forma sare, în care aminoacidul nu posedă o sarcină electrică netă, puterea de tamponare a soluției este nulă.

Să considerăm echilibrul :

$$\text{acid} \rightleftarrows \text{sare} + H^+$$

pentru care constanta de echilibru K este dată de relația :

$$K_a = \frac{(\text{sare})(H^+)}{(\text{acid})}$$

din care se poate determina concentrația de ioni în hidrogen :

$$(H^+) = K_a \frac{(\text{acid})}{(\text{sare})}$$

și indirect,

$$pH = pK_a + \log \frac{(\text{sare})}{(\text{acid})}$$

Cînd (sare)=(acid), pH=pK_a — acesta fiind domeniul de pH acid la care aminoacidul are cea mai mare capacitate de tamponare. Similar, pentru echilibrul :

$$\text{sare} \rightleftarrows \text{bază} + H^+$$

$$pH = pK_b + \log \frac{(\text{bază})}{(\text{sare})}$$

care indică faptul că la pH=pK_b soluția are un pH alcalin la care se înregistrează cea mai mare capacitate de tamponare.

Pentru pH izoelectric, cînd (acid)=(bază) relațiile vor fi :

$$\frac{(H^+)(\text{sare})}{K_a} = K_b \frac{(\text{sare})}{(H^+)}$$

$$(H^+)^2 = K_a \cdot K_b$$

și deci,

$$pH_i = \frac{pK_a + pK_b}{2}$$

Soluții

— soluții 0,1 M de glicină și alanină ;
— soluție NaOH 0,5 M ;
— soluție HCl 0,5 M.

Aparatură

— pH metru
— biuretă

Modul de lucru

Se pipetează 20 ml soluție de aminoacid 0,1 M într-un pahar Berzelius și se determină pH soluției cu ajutorul pH-metrului. Dintr-o biuretă se adaugă HCl 0,5 N, picătură cu picătură, sub agitarea permanentă, în paharul cu soluția de aminoacid. Se notează valorile de pH determinate la pH-metru, corespunzătoare unor anumite volume cunoscute ale soluției de HCl 0,5 adăugate. Titrarea se continuă pînă pH mediului scade la 1,3. La începutul titrării valoarea pH soluției de aminoacid se modifică brusc după fiecare picătură de HCl 0,5 M adăugată, pentru ca spre sfîrșitul titrării modificările de pH să fie mult mai lente.

Într-un pahar Berzelius se pipetează tot 20 ml soluție a aceluiași aminoacid 0,1 M, care se titrează similar cu o soluție de NaOH 0,5 M, pînă la pH 12,5.

Datele obținute se înscriu într-un grafic și ele permit determinarea pH izoelectric a aminoacidului titrat. Mai jos sînt prezentate valorile pK pentru cinci aminoacizi în vederea comparării lor cu datele experimentale obținute :

	pK_1	pK_2	pK_3
Glicina	2,4	9,7	—
Alanina	2,3	9,9	—
Acid glutamic	2,2	4,3	9,7
Histidina	1,8	6,0	9,2
Lizina	2,2	9,2	10,8

Experiența 5. DOZAREA AMINOACIZILOR CU NINHIDRINĂ

Reacția aminoacizilor cu ninhidrina, utilizată curent în detectarea lor pe cormatograme sau în eluatele obținute de pe coloane umplute cu schimbători de ioni, poate fi transformată într-o metodă cantitativă de dozare a lor. Trebuie ținut seama de faptul că nu toți aminoacizii dau complexe la fel de intens colorate și că iminoacizii — prolina și hidroxiprolina — dau o colorație galbenă, colorimetrabilă la 440 nm.

Soluții

— aminoacizii (acid aspartic, alanina, lizina, prolina), soluții 2×10^{-4}M ;
— soluție tampon CH_3-COOH-CH_3-COONa 1 M, pH 5,5 ;
— metil celosolv ;
— soluție apoasă de etanol 50% ;

— reactiv ninihidrină (se dizolvă 0,8 g ninhidrină și 0,12 g hidrindantină în 30 ml metil celoslov și se adaugă 10 ml soluție tampon acetat) proaspăt preparat.

Modul de lucru

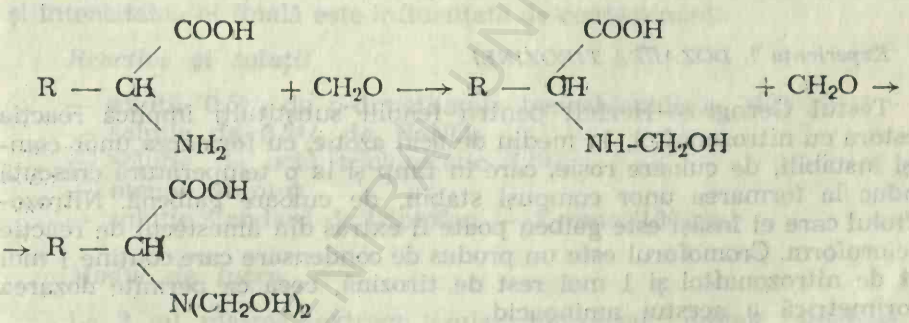
În eprubete paralele se pipetează cîte 2 ml soluție din aminoacidul de testat și 2 ml reactiv ninhidrină, după care amestecul de reacție este incubat timp de 15 minute pe o baie de apă, la fierbere. Probele se răcesc la temperatura camerii și apoi se adaugă 3 ml etanol 50%. După 10 minute probele sînt colorimetrate la 570 nm (sau la 440 nm în cazul particular al prolinei) față de apă distilată, —E_s

Probe de 2 ml soluție aminoacid de concentrație necunoscută sînt prelucrate similar și se determină extincția — E_x Concentrația poate fi calculată din formula :

$$c = \frac{E_x}{E_s} \cdot 200 \text{ nmoli}$$

Experiența 6. TITRAREA AMINOACIZILOR CU FORMOL

Gruparea amino a aminoacizilor este blocată prin reacția cu formaldehidă :



iar aciditatea grupării carboxil este titrată cu o soluție de NaOH, în prezența fenolftaleinei ca indicator.

Soluții

— formaldehidă 40% ;
— soluție NaOH 0,1 N ;
— fenolftaleină 1% ;
— soluția unui aminoacid cunoscut, cu o concentrație cuprinsă între 0,07 M — 0,13 M.

Modul de lucru

În prima parte a experimentului se procedează la neutralizarea soluției de formaldehidă, care conține mici cantități de acid. În acest scop se amestecă 10 ml formaldehidă 40% cu 20 ml apă distilată și cu 3—4

picături de fenolftaleină, după care se adaugă NaOH 0,1 M pînă la apariția unei colorații roz persistente. Volumul soluției de hidroxd de sodiu folosit pentru neutralizarea soluției de formaldehidă nu prezintă nici o semnificație și nu se notează.

În vederea dozării concentrației aminoacidului studiat se pipetează într-un vas Erlenmeyer 25 ml soluție de aminoacid și 3—4 picături de fenolftaleină, după care dintr-o biuretă se adaugă NaOH 0,1 N pînă la apariția unei colorații roz persistente. La soluția aminoacidului neutralizată se adaugă 30 ml din soluția de formaldehidă (neutralizată după procedeu descris mai sus) cînd se observă dispariția culorii roz. Amestecul rezultat se titrează cu soluție NaOH 0,1 N pînă la reapariția culorii roz. Se notează volumul folosit pentru titrare (± ml NaOH 0,1 N).

Calculul rezultatelor

Ținînd seama că unui mol de NaOH îi corespunde un mol de aminoacid și 14 g azot aminic și notînd cu *a* — molaritatea soluției de NaOH, putem calcula concentrația aminoacidului din soluție :

14.x.a. = mg azot/25 ml soluție aminoacid.

Rezultatele finale pot fi exprimate atît în g azot aminic la litru, cît și în g aminoacid/litru soluție.

Experiența 7. DOZAREA TIROZINEI

Testul Gerngross-Herfelt pentru fenolii substituiți implică reacția acestora cu nitrozonaftol, în mediu de acid azotic, cu formarea unor compuși instabili, de culoare roșie, care în timp și la o temperatură crescută conduc la formarea unor compuși stabili, de culoare galbenă. Nitrozonaftolul care el însăși este galben poate fi extras din amestecul de reacție cu cloroform. Cromoforul este un produs de condensare care conține 1 mol rest de nitrozonaftol și 1 mol rest de tirozină, ceea ce permite dozarea colorimetrică a acestui aminoacid.

Reactivi și soluții

— soluție 0,1% de 1-nitrozo-2-naftol în etanol 95%
— reactiv nitric : acid azotic diluat 1 : 5 ce conține 0,5 mg/ml $NaNO_2$
— soluție 30% de acid tricloracetic
— cloroform
— soluție standard de tirozină 0,4 mmoli/1 000 ml.

Modul de lucru

La 1 ml plasmă (sau extract tisular) se adaugă 3 ml apă și 1 ml soluție de acid tricloracetic 30%. După 10 minute, amestecul se centrifughează, iar la 2 ml supernatant se adaugă 1 ml soluție de nitrozonaftol și 1 ml reactiv nitric. Probele sînt incubate la 55°C, timp de 30 minute.

După răcirea lor, se adaugă 10 ml cloroform pentru a extrage nitrozonaftolul rămas nereacționat. Pentru separarea celor două faze, probele se centrifughează la o turație mică, iar stratul apos superior este colorimetrat la 450 nm. Culoarea este stabilă chiar dacă probele sînt lăsate peste noapte.

Densitățile optice citite sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon în care concentrații variind de la 0,03—0,8 µmoli/2 ml tirozină sînt tratate similar ca probele.

Observații

Se apreciază că numai 57% din tirozină prezentă este recuperată, 27% suferă reacții de nitrare, ar 19% din compusul de condensare cu nitrozonaftolul este îndepărtat prin extracție cu cloroform.

Din plasmă și din omogenatele hepatice numai cantități mai mari de 0,3 µmoli sînt recuperate cantitativ, datorită coprecipitării cu proteinele.

Metoda nu face distincție între tirozină și tiramină.

Experiența 8. DOZAREA TRIPTOFANULUI

Nucleul indolic al tripotofanului suferă o reacție de condensare cu aldehidele, ce poate fi utilizată în scopuri analitice. Procedeele sînt sensibile și specifice pentru compușii indolici, dar viteza dezvoltării culorii și intensitatea ei finală este influențată de contaminanți.

Reactivi și soluții

— soluție 0,5% de p-dimetilaminobenzaldehidă în HCl 12 N
— soluție de 0,2% de $NaNO_2$
— soluție de acid tricloracetic 7,5%
— etanol absolut
— soluție standard de triptofan — 1 mmol/1000 ml

Modul de lucru

La 2 ml plasmă (extract tisular, hidrolizat proteic, amestec de reacție enzimatică) se adaugă 2 ml soluție de acid tricloracetic 7,5%. După 10 minute, amestecul se centrifughează, iar la 0,5 ml supernatant se adaugă 2,5 ml soluție 0,5% de p-dimetilaminobenzaldehidă. După 30 minute de staționare la temperatura camerii și la întuneric, se adaugă 2,5 ml etanol absolut și 2—3 picături din soluția de $NaNO_2$. După 30 minute, se citește extincția compusului colorat în albastru, la 620 nm.

Densitățile optice citite sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon în care concentrații variind de la 0,05 la 0,5 µmoli triptofan 0,5 ml sînt tratate similar cu probele.

Observații

Toți compușii indolici prezenți în mediu reacționează similar. Metoda permite determinarea triptofanului în prezența de kinurenină, 3-hidroxikinurenină și alți metaboliți neindolici.

Experiența 9. DOZAREA COMPUȘILOR IMIDAZOLICI

Majoritatea metodelor utilizate pentru dozarea compușilor imidazolici reprezintă modificări ale reacției Pauly, în care ei reacționează cu acidul sulfanilic diazotat, la pH alcalin.

Reactivi și soluții

— reactivul diazo : 10 ml dintr-o soluție 0,1% de p-nitroanilină în 0,1 N HCl sînt răciți pe gheață și tratați cu 1 ml soluție 4% de $NaNO_2$; reactivul este stabil 3—4 ore la rece.

— soluție 0,4 N de HCl ;

— soluție 20% de Na_2CO_3 ;

— butanol terțiar ;

— soluție 5 N de NaOH ;

— soluție standard de histidină 1 mmol/1 000 ml ;

— metil izobutil cetonă ;

— soluție de acid tricloracetic 10% ;

— soluție standard de histamină 1 mmol/1 000 ml.

Modul de lucru

0,5 ml soluție de testat sînt tratați cu 2 ml HCl 0,4 N și amestecul este răcit pe gheață. Se adaugă 0,5 ml reactiv diazo, sub agitare, apoi se adaugă succesiv, de trei ori cîte 0,1 ml Na_2CO_3 20%. La amestecul de reacție se pipetează 1 ml butanol terțiar, 0,2 ml soluție 20% de Na_2CO_3 și 0,12 ml soluție 5 N de NaOH. Se formează un compus de culoare roșie, care este colorimetrat la 550 nm.

Densitățile optice sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon, în care concentrații variind de la 0,05—0,5 μmoli/0,5 ml sînt tratate similar ca probele.

Pentru dozarea histaminei azoderivatul este extras în metil izobutil catonă și separat astfel de compusul format cu histidină. 0,5 ml soluție de testat sînt tratați cu 2 ml soluție de acid tricloracetic 10% și după 10 minute amestecul este centrifugat. La supernatant se adaugă 0,5 ml reactiv diazo și apoi 0,6 ml soluție 20% de Na_2CO_3. După amestecare energică, se adaugă încă 0,25 ml soluție de carbonat sodic și după un minut, se pipetează 0,3 ml soluție 5 N de NaOH (pH final al amestecului de reacție trebuie să fie 10,1—10,5). Se realizează o extracție cu 2 ml metil izobutil cetonă, și stratul organic colorimetrat la 550 nm.

Densitățile optice sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul soluției standard de histamină.

Metodele de separare a aminoacizilor și peptidelor

În această secțiune vom prezenta separarea aminoacizilor și peptidelor dintr-un amestec (de exemplu dintr-un hidrolizat proteic) utilizînd cromatografia de partiție (pe hîrtie și în strat subțire), cromatografia de schimb ionic și electroforeza.

Experiența 10. CROMATOGRAFIA PE HÎRTIE

Cromatografia pe hîrtie este un tip de cromatografie de partiție, în care compușii solubili atît în apă cît și în solvenți organici pot fi separați datorită capacității lor de a se repartiza diferențiat între cele două faze nemiscibile, conform coeficientului de partiție α :

$$\alpha = \frac{\text{concentrația compusului A în solventul 1}}{\text{concentrația compusului A în solventul 2}}$$

Unul din solvenți este apa, legată la suportul cromatografic (hîrtia) și constituind cu aceasta — *faza staționară*. Celălalt solvent constă în lichidul de eluție (un solvent organic sau un amestec de solvenți organici saturați cu apă) și constituie *faza mobilă*.

Celuloza, sub forma unor coli de hîrtie cromatografică, reprezintă un suport ideal pe care apa este adsorbită și pe care se poate realiza separarea aminoacizilor și peptidelor. Un amestec de substanțe este aplicat în punctul de start, pe hîrtia care este suspendată într-un tanc cromatografic care conține solventul de eluție (faza mobilă). Cînd acesta din urmă atinge spotul, se stabilește un echilibru al componentelor amestecului între faza mobilă și faza staționară (celuloza îmbibată cu apă). Unele molecule preferă faza staționară și rămîn în aceeași poziție sau migrează foarte lent, în timp ce altele preferă faza mobilă și migrează rapid cu solventul de eluție. Pe parcursul unei separări cromatografice, procesul de distribuție a substanțelor dintr-un amestec, între cele două faze, este repetat de un mare număr de ori, în final componentele separîndu-se în funcție de coeficienții lor de partiție.

În principal, tehnica separării este următoarea : hîrtia cromatografică pe care s-a aplicat amestecul de separat este introdusă într-un tanc, închis etanș, în care este pus solventul de developare. Eluția este considerată încheiată cînd lichidul a spălat aproape întreaga coală de hîrtie. Frontul solventului este marcat și după uscarea hîrtiei se procedează la vizualizarea componentelor separate, printr-o reacție de culoare. Se calculează R_f (factor de retenție) :

$$R_f = \frac{\text{distanța parcursă de zona cromatografică a unui compus}}{\text{distanța parcursă de frontul solventului}}$$

care este o carcteristică pentru fiecare compus, permițînd identificarea lui. Valorile R_f ale aminoacizilor variază cu sistemul solvent de developare utilizat, cu hîrtia cromatografică, cu concentrația probei aplicată în punctul de strat, cu temperatura, cu pH amestecului etc. Între R_f și coeficientul de partiție α există relația :

$$\alpha = \frac{S_m}{S_s}\left(\frac{1}{R_f} - 1\right)$$

unde S_m este suprafața secțiunii transversale prin faza mobilă, iar S_s este suprafața secțiunii transversale prin faza staționară.

Pentru a evita eventuale erori în identificarea sporturilor de aminoacizi sau peptide, datorită variabilității valorilor R_f în funcție de con-

diţiile concrete ale separării, se recomandă ca pe aceeaşi coală de hîrtie cromatografică să fie aplicate probe cu substanţe standard pentru comparaţia directă.

Prelucrarea probei. În soluţiile care urmează să fie supuse cromatografierii se găsesc o serie de substanţe : proteine, glucide, lipide, săruri, uree care pot interfera cu separarea efectivă. Îndepărtarea proteinelor se realizează prin fierbere sau prin percipitare cu acetonă, etanol sau la pH izoelectric. Zaharurile pot fi îndepărtate cu ajutorul schimbătorilor de ioni, fiind eluate liber. Lipidele sînt îndepărtate prin extracţie cu solvenţi organici. Concentraţiile mari de săruri provoacă împrăştierea zonelor cromatografice, modificarea R_f şi pot interfera cu reacţiile de vizualizare a componentelor. Sărurile se îndepărtează prin electroliză, iar ureea prin tratare cu urează.

Alegerea hîrtiei cromatografice. Celuloza este un polizaharid alcătuit din resturi de glucoză, legate β-1,4, capabil de a reţine o cantitate apreciabilă de apă (aproximativ 22%). Colile de hîrtie cromatografică sînt obţinute din celuloză pură şi sînt fabricate special într-o mare varietate de forme şi porozităţi, asigurînd rezultate reproductibile. Următoarele hîrtii pot fi utilizate pentru cromatografia calitativă şi semicantitativă : Whatman, Schleicher-Schüll şi Macherey-Nagel. Fibrele de celuloză sînt dispuse paralel cu o regularitate microscopică. Firma producătoare indică pe ambalaj direcţia de orientare a fibrelor de celuloză, deci cea mai rapidă direcţie de developare. Pentru scopuri analitice cel mai des folosită este Whatman No. 1. Hîrtia Whatman 3 MM este utilizată pentru separarea unor cantităţi mari de aminoacizi şi peptide, dar cu o rezoluţie inferioară. Hîrtiile Whatman No. 4 şi No. 5 realizează separări rapide dar în dauna capacităţii de rezoluţie. De pe hîrtiile Whatman eluţia poate fi realizată cu apă distilată, fără ca din hîrtie să iasă substanţe care să afecteze colorimetrările. De pe hîrtiile Schleicher-Schüll eluaţia se realizează cu acid acetic diluat, dar conduce la bancuri mari.

Alegerea solventului. Un solvent convenabil în separarea unor componente ale unui amestec trebuie să realizeze distribuirea lor pe întreaga lungime a hîrtiei, fiecare substanţă trebuie să aibă un R_f cuprins între 0,05 şi 0,85, iar diferenţa între valorile R_f a două componente care migrează una după alta trebuie să fie mai mare de 0,05. De asemenea, solventul de developare trebuie să nu interacţioneze chimic cu hîrtia, cu substanţele de separare şi cu reactivii de vizualizare. În continuare vom prezenta cîteva sisteme solvent, developante pentru aminoacizi :

2-butanol : 3% amoniac (3 : 1) ;
alcool amilic terţiar saturat cu apă (14—21 zile)
alcool benzilic saturat cu apă
n-butanol : etanol : apă (4 : 1 : 1)
n-butanol : acid acetic : apă (9 : 1 : 1)
fenol : apă : amoniac (160 : 40 : 1)

Aplicarea probei. Soluţia de analizat, prelucrată corespunzător, este pipetată în punctul *start*, prin uscare, sub forma unor spoturi rotunde cu un diametru de maxim 11 mm, sau sub forma unor linii transversale.

Pipetarea se face cu ajutorul unor micropipete speciale hematologice (10—20 µl probă). Cînd se aplică volume mai mari este absolut necesară uscarea în curent de aer sau prin încălzire. În afară de acest mod de aplicare a probei prin pipetare într-un punct de plecare, aplicarea probei se poate realiza și prin eluție capilară, introducînd hîrtia cromatografică într-un vas în care se află soluția de analizat. Pe cromatogramă poate fi aplicată și proba în stare de pulbere, după cum procedeul poate fi extins și la aplicarea directă a unor secțiuni de țesuturi.

Aplicarea aminoacizilor martor. Pentru identificarea spoturilor separate cromatografic și pentru semicantitativarea rezultatelor se recomandă aplicarea pe hîrtia cromatografică de aminoacizi martor. Cisteina și metionina, fiind compuși instabili, nu pot constitui ca atare martori ci trebuie mai întîi oxidați la acid cistic și respectiv la metionin sulfonă. Lîngă start rămîne acidul cisteic, apoi în ordinea creșterii capacității de eluție urmează amnioacizii : lizina, histidina, arginina, acidul aspartic, metionin sulfona, serina, glicina, acidul glutamic, treonina, alanina, prolina, tirozina, valina, fenilalanina, leucina. Uneori este introdus și un spot cu Roșu Neutru, un indicator care are un R_f identic cu cel al leucinei, compusul care migrează cel mai rapid.

Developarea. Această operație poate fi efectuată în direcție descendentă, ascendentă, orizontală, circulară, poate fi repetată pe aceeași dimensiune sau bidimensional. Developarea este efectuată după suspendarea hîrtiei cromatografice într-un tanc, închis etanș, în care se găsește solventul. Fluctuațiile de temperatură afectînd vitezele de migrare ale componentelor (valorile R_f) se recomandă plasarea tancului într-o cameră cu o atmosferă constantă, lipsită de curenți de aer, iar separarea să fie realizată la temperatura camerii.

Detectarea spoturilor. Aminoacizii fiind compuși incolori, spoturile lor trebuie vizualizate cu reactivi specifici. Se pulverizează reactivul de detectare pe suprafața hîrtiei sau se scufundă aceasta în soluția de colorare.

Reacția ninhidrinei. Ninhidrina reacționează cu toți aminoacizii producînd colorații albastru-roșu, cu excepția prolinei și hidroxiprolinei care formează compuși de culoare galbenă. Culoarea poate fi influențată prin adiția cu Cu^{2+}, Cd^{2+}, etc. În continuare vom prezenta mai multe variante de preparare a reactivului cu ninhidrină.

i) 0,3 g ninhidrină sînt dizolvate în 100 ml n-butanol, la care se adaugă 3 ml acid acetic glacial. Cromatograma uscată este pulverizată cu acest reactiv. După încălzire la 110°C timp de 10 minute apar spoturile aminoacizilor colorate.

ii) 5 g ninhidrină sînt dizolvate în 955 ml acetonă, apoi se adaugă 25 ml acid acetic și 20 ml 2, 4, 6-colidină. Vizualizarea se face, de asemenea, după încălzire la 110°C timp de 10 minute.

Detectarea policromatică. Se prepară două soluții : A — 0,1 g ninhidrină se dizolvă în 50 ml etanol absolut, la care se adaugă 10 ml acid acetic glacial și 2 ml 2, 4, 6-colidină ; B — 0,5 g $Cu(NO_3)_2 \cdot 3\ H_2O$ sînt dizolvate în 50 ml etanol absolut. Imediat înainte de utilizare se amestecă A și B, în raport de 50 : 3 și se pulverizează hîrtia cromatografică.

Se încălzesc cromatogramele 4 minute la 110°C și se notează culorile imediat, deoarece după 10 minute acestea încep să pălească. În tabelul următor vom indica culorile specifice, fiecărui aminoacid.

Aminoacid	Culoarea
Cistina	cenușiu
Lizina	brun roșu, formează un inel roz la staționare
Histidina	brun strălucitor, cu un inel brun închis, în interior un inel galben
Asparagina	auriu
Arginina	purpuriu închis
Serina	brun verzui, la staționare formează un inel roșu
Glicina	brun oranj cu un inel oranj strălucitor
Treonima	brun verzui, se modifică la purpuriu prin staționare
Alanina	purpuriu închis
Prolina	verde strălucitor cu un inel galben
Cisteina	verde
Tirozina	brun luminos
Valina	purpuriu
Metionina	purpuriu cenușiu cu un inel galben
Triptofan	brun cu un inel albastru luminos, care dispare rapid
Fenilanina	galben verzui
Leucina	purpuriu luminos cu un inel galben

O altă tehnică de detectare policromatică a aminoacizilor utilizează reactivul ninhidrină-cadmiu. 1 g ninhidrină este dizolvat în 100 ml acetonă. 0,1 g acetat de cadiu sînt dizolvate în 10 ml apă distilată, la care se adaugă 5 ml acid acetic glacial. Cele două soluții se amestecă și se păstrează într-o sticlă brună. Cromatograma uscată este scufundată în reactivul de vizualizare, apoi se usucă în aer, la întuneric. După 2 ore de staționare la temperatura camerii, spoturile aminoacizilor sînt colorate cu o intensitate maximă.

O alternativă de detectare policromatică este cea care utilizează dietilamina. După separarea cromatografică în solventul : butanol- acid acetic-apă, hîrtia umedă este expusă timp de două minute la vapori de dietilamină. Hîrtia este uscată la 80°C pulverizată cu o soluție 0,25% de ninhidrină în n-butanol și încălzită 10 minute la 80°C. Aminoacizii colorați sînt evidențiați pe un fond albastru luminos. În tabelul următor prezentăm culorile aminoacizilor după colorare cu ninhidrină-dietilamină.

Aminoacid	Culoarea
Acid aspartic	albastru-verde
Glicina	roșu
Histidina	brun
Hidroxiprolina	salmon
Lizina	gri-albastru
Fenilalanina	galben-brun
Prolina	galben
Serina	brun întunecat
Treonina	albastru
Triptofan	brun
Tirozina	galben-brun
Ceilalți	purpurii

Detectarea argininei și a altor derivați guanidinici. Se prepară două soluții : A : 0,01 α-naftol în etanol 95%, ce conține 5% uree ; B : 2 g brom în 100 ml NaOH 8%. La soluția A se adaugă 5 granule de NaOH și cromatograma este pulverizată cu supernatantul acestei soluții. Hîrtia cromatografică este uscată în aer și apoi pulverizată cu soluția B. Arginina și peptidele care conțin resturi arginil sînt vizualizate ca spoturi roșii.

Detectarea histidinei. Reacția de vizualizare a acestui aminoacid se realizează cu ajutorul reactivului Pauly, care se prepară din două soluții, A : se dizolvă 50 g acid sulfanilic în 250 ml KOH 10% și se adaugă 200 ml $NaNO_2$ 10% și B : la 80 ml HCl concentrat se adaugă 40 ml apă distilată. La soluția B, ținută la rece se adaugă, picătură cu picătură, sub agitare și la rece, soluția A. Se formează un precipitat care este separat prin filtrare și uscat la temperatura camerii.

Soluția de pulverizare se prepară din dizolvarea a 0,1 g reactiv Pauly în 100 ml Na_2CO_3 20%. După pulverizarea cromatogramei, histidina și peptidele care conțin resturi histidinil sînt colorate ca spoturi roșii pe un fond galben. Tirozina liberă și peptidele care conțin resturi tirozil dau spoturi cu nuanțe purpurii sau albastru-gri, care însă se decolorează rapid.

Detectarea tirozinei. Reactivul de vizualizare se prepară prin dizolvarea a 0,1 g α-nitro-β-naftol în 100 ml etanol 75%. Hîrtia cromatografică este pulverizată, uscată și din nou pulverizată cu o soluție de acid azotic 10%. După uscare, cromatograma este încălzită la 90°C timp de 3 minute. Tirozina și peptidele care conțin resturi tirozil dau spoturi colorate în roșu pe un fond verde deschis.

Detectarea triptofanului. Soluția de pulverizare se prepară din 0,5 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 100 ml etanol 95% ce conține 2 ml HCl concentrat. După cîteva ore triptofanul apare cu un spot violet, kinurenina — oranj, iar citrulina — galben. Reactivul nu este complet specific pentru compușii care conțin un nucleu indolic, ureidele și aminele aromatice dînd compuși galben-pal cu soluția de pulverizare. De asemenea, reactivul interferă în reacția de vizualizare a hidroxiprolinei, după tratamentul cu izatină.

Detectarea prolinei și hidroxiprolinei. Reactivul de vizualizare se prepară prin dizolvarea a 0,1 g izatină în 50 ml butanol, la care se adaugă 5 ml acid acetic glacial. Cromatograma pulverizată cu acest reactiv este încălzită la 40°C timp de 5 minute, cînd prolina și peptidele care conțin resturi prolil dau spoturi intens colorate în albastru. Fenilalanina și tiroxina interferă, dînd spoturi albastru-verzi.

Detectarea lizinei, ornitinei și aminelor. Se prepară două soluții, A : 2 g vanilină se dizolvă în 100 ml n-propanol și B : KOH 1% în etanol. Se pulverizează cromatograma cu soluția A, se încălzește la 110°C, 10 minute. Ornitina prezintă în ultraviolet o fluorescență galben-verde, iar lizina — slab verde. După pulverizarea soluției B, ornitina se colorează roșu-salmon, apoi se decolorează lent, în timp ce prolina, hidroxiprolina, acidul pipecolinic și sarcozina formează spoturi roșii, stabile cîteva ore. Glicina este colorată în galben-albastru, iar ceilalți aminoacizi — în brun deschis.

Detectarea tio-aminoacizilor. În timpul separării cromatografice cistina, cisteina și metionina suferă reacții parțiale de oxidare. Pentru detectarea cistinei sau peptidelor care conțin cistină cromatograma este plasată pe o hîrtie de filtru umectată cu o soluție conținînd 0,5 g NaCN în 2 ml apă, diluată la un volum final de 25 ml cu metanol. Apoi este pulverizată, rapid cu o soluție preparată prin dizolvarea a 0,25 g de nitroprusiat de sodiu în 1 ml H_2SO_4 diluat, la care se adaugă 2 ml NH_3 concentrat și se aduce la un volum final de 25 ml cu metanol. Soluția de pulverizare trebuie filtrată înaintea utilizării. Se obțin spoturi roșii, putîndu-se detecta cantități mai mari de 0,5 μg. Cisteina poate fi vizualizată prin pulverizarea cromatogramei cu o soluție de 0,5% clorură de trfeniltetrazoliu în cloroform, uscare și apoi o a doua pulverizare cu o soluție alcoolică de 10% Na_2CO_3. Cisteina apare sub forma unui spot roșu.

Detectarea glicinei și taurinei. Cromatograma este pulverizată cu o soluție 0,2% de o-ftalaldehidă, după care este încălzită la 100°C timp de 2 minute. Urmează scufundarea hîrtiei într-o soluție 1% de KOH preparată în etanol 95% și încălzirea ei la 100°C timp de 10 minute, cînd glicina apare sub forma unui spot colorat în verde, iar taurina — în roșu.

Detectarea peptidelor. Prin pulverizarea cromatogramelor cu reactiv de ninhidrină, spoturile peptidelor apar foarte slab colorate. Peptidele ciclice, peptidele acide și cele cu grupările amino-termnale substituite (acilate) nu dau reacții de culoare cu ninhidrina. Pentru detectarea peptidelor se recomandă ca cromatograma uscată s ăfie ținută într-o atmosferă de clor, într-un vas închis,timp de 30 minute. După îndepărtarea excesului de clor, hîrtia cromatografică este pulverizată cu o soluție apoasă 1% de amidon solubil ce conțin 1% KI. Compușii conținînd legături -CO-NH- apar ca zone colorate în albastru închis.

Separarea aminoacizilor dintr-un hidrolizat proteic prin cromatografie bidimensională

Soluții și materiale

— obținerea hidrolizatului proteic: Se plasează 50 mg material biologic într-un balon de refluxare ,se adaugă 50 ml HCl 6 N și se refluxează 20 ore. Se rearanjează aparatul pentru distilare și se distilă HCl pînă la evaporarea lui completă. Rezidiul se dizolvă în 5 ml apă caldă, se filtrează și din nou se evaporă soluția apoasă la sec. Se dizolvă rezidiul în 2 ml etanol 20%.

— solvent 1 : butanol-acid acetic-apă (120—30—50).

— solvent 1 : fenol-apă-amoniac (160—40—1), se prepară prin adăugarea a 125 ml apă la 500 g fenol într-o sticlă brună, care este imersată într-o baie de apă la 40°C pînă soluția devine omogenă. Cantitatea necesară de amoniac este adăugată la soluția de fenol imediat înaintea utilizării.

— soluție 0,2% ninhidrină în acetonă.

— soluții standard de aminoacizi, 1% în izopropanol 10% (în anumite cazuri este necesară adăugarea unei picături de acid sau bază pentru solubilizare).

— hîrtia cromatografică, Whatman No. 1 30 × 30 cm.

Modul de lucru

Se plasează 150—200 ml din solventul 1 într-un tanc cromatografic și se lasă ca atmosfera din tanc să se satureze în vaporii solventului. Se marchează, pe hîrtia cromatografică, poziția start la 3 cm într-un colț al acesteia. Cu ajutorul unei micropipete se pun în spot 10 µl din hidrolizatul proteic lăsînd soluția să se usuce după adiția fiecărei picături. Se plasează cromatograma în tanc și se lasă să migreze peste noapte (aproximativ 16 ore). Se scoate cromatograma din tanc, se marchează frontul solventului și se usucă.

Se spală tancul și ise introduc 150—200 ml din solventul 2. Se așează cromatograma într-o poziție perpendiculară pe prima direcție de developare, și se lasă să migreze peste noapte (16 ore). Se usucă hîrtia cromatografică timp de patru ore la temperatura camerii, după care se scufundă într-un vas umplut cu reactivul de ninhidrină. Se încălzește la 105°C timp de 10 minute, cînd se vizualizează spoturile de aminoacizi

Experiența 11. CROMATOGRAFIA ÎN STRAT SUBȚIRE

Separarea aminoacizilor, peptidelor și derivaților lor pe un strat subțire de adsorbant se realizează în aceleași condiții ca și în cromatografia pe hîrtie. Separarea este însă mai rapidă și puterea de rezoluție este cu un ordin de mărime superioară celei obținute în cromatografia pe hîrtie.

Pentru a forma stratul cromatografic, suspensia apoasă a adsorbantului trebuie aplicată pe plăci de sticlă sau folii de material plastic. Pentru prepararea straturilor sînt accesibile aparate speciale (Desaga, Camag, tip Hungarian Labor) cu un aplicator staționar, deplasîndu-se placa, sau se realizează un aplicator mobil și placa fixată. Straturi de grosimi mai puțin uniforme se obțin prin turnarea suspensiei direct pe placă, urmată de nivelarea ei, sau prin cufundarea plăcilor în suspensie sau prin pulverizarea suspensiei pe placă. Există multe posibilități de obținere a unor straturi cromatografice, cu grosimi uniforme care nu depășesc 1 mm grosime. Pentru analize calitative se recomandă straturi cromatografice cu o grosime de 0,25 mm, în scopuri preparative — de 5 mm.

În prezenta lucrare practică, dispozitivul de aplicare a stratului cromatografic este confecționat dintr-un bloc de alamă cromată, în care se pot plasa 150 ml suspensie, cantitate suficientă pentru a acoperi 10 plăci de 20 × 20 cm, cu un strat de 0,25 mm grosime.

Straturile astfel preparate sînt lăsate să se usuce în aer, apoi sînt „activate' prin încălzire la 60—120°C timp de 30 minute. Pentru a obține straturi foarte active, plăcile acoperite cu silicagel sau alumină sînt încălzite la 150°C, timp de 3—4 ore. Această activare este utilă numai dacă aplicarea ulterioară a probei se realizează într-o atmosferă uscată și dacă eluția este efectuată cu solvenți uscați. În cazul particular al separării cromatografice a unor compuși polari cum sînt aminoacizii este suficientă uscarea plăcilor peste noapte, la temperatura camerii.

Păstrarea plăcilor cromatografice se realizează în stative plasate în locuri ferite de umiditate (eventual în exicatoare) în poziție orizontală sau verticală. Plăcile trebuie protejate contra atmosferei de laborator.

Aplicarea sporturilor se face la circa 1,5 cm de la una din laturi, cu ajutorul unei micropipete gradate. Proba se aplică în porțiuni mici (odată, aproximativ 5 μl), după care spotul se usucă în curent de aer. Cantitatea de material aplicată pe placă n-are un efect marcant asupra migrării. Totuși, dacă placa este supraîncărcată, spoturile se deformează. Limitele de detectabilitate și maximum de cantitate aplicabilă pe placă variază cu proprietățile adsorbantului și cu amestecul de fracționat.

În experimentul prezent se va efectua o cromatografie de tip ascendent. Ea va fi realizată într-un tanc de sticlă, acoperit cu o placă. Solventul este plasat la baza tancului cu cel puțin o oră înainte de a se începe separarea cromatografică. În tanc trebuie realizată o atmosferă saturată în solventul de developare, condiție facilitată de căptușirea tancului cu o hîrtie cromatografică îmbibată în solvent. Dacă această condiție nu este realizată, la developarea spoturilor se constată apariția efectelor marginale: aceleași substanțe migrează mai rapid la marginile plăcilor decît în centrul lor. În cazul cromatografiei în strat subțire există riscul evaporării solventului pe strat, mărindu-se timpul necesar separării pe o anumită distanță. În cazul unui amestec de mai mulți solvenți, componentele mai volatile se evaporă primele, compoziția amestecului modificîndu-se pe parcursul separării cromatografice.

Similar cromatografiei pe hîrtie și în separările pe straturi subțiri de adsorbanți se poate utiliza tehnica bidimensională, în care într-o dimensiune se poate efectua o separare electroforetică. Pentru acest scop sînt necesare celule electroforetice speciale cu un spațiu redus, contactele dintre compartimentele electrod și strat fiind asigurate de șnaifuri, fabricate din hîrtie de filtru. Răcirea dispozitivului este o problemă deoarece placa de sticlă este un izolator termic și face dificilă disiparea căldurii. Pentru a reduce generarea de căldură se utilizează soluții tampon cu tărie ionică cît mai mică posibil.

Separarea cromatografică poate fi condusă la temperatura camerii (18°—23°C), acest factor fizic avînd un mic efect asupra separării efective. În majoritatea cazurilor, separările trebuie efectuate în lumină difuză, trebuind evitată lumina soarelui.

Developarea plăcilor se realizează cu sisteme adecvate naturii chimice a substanțelor care urmează a fi separate. Developantul se deplasează printre particulele adsorbantului purtînd cu el substanțele de separat. După terminarea eluției, atunci cînd frontul sistemului developant a atins cealaltă extremitate a plăcii, acestea sînt scoase din tancul cromatografic, se usucă și se identifică substanțele separate.

Vizualizarea substanțelor incolore separate se realizează utilizînd reactivi specifici.

Pentru separarea cromatografică a aminoacizilor se utilizează straturi de silicagel și celuloză. Deoarece straturile de silicagel limitează detectabilitatea aminoacizilor individuali, în separarea acestor biomolecule se utilizează în special straturile de celuloză.

Prepararea stratului : se realizează o suspensie omogenă din 8 g pudră de celuloză (Macherey-Nagel, MN 300), 48 ml apă distilată și 2 ml etanol — cantitate suficientă pentru prepararea a 5 plăci cu un strat de 0,25 mm grosime. Straturile sînt uscate la temperatura camerii, peste noapte.

Cromatografierea : pentru separarea cromatografică în prima dimensiune se utilizează sistemul solvent :

n-butanol : acetonă : dietilamină : apă (10 : 10 : 2 : 5)

iar pentru cea de-a doua dimensiune de migrare se poate utiliza unul din următoarele sisteme solvent :

fenol : apă (75 : 25) cu 3% amoniac apos

izopropanol : acid formic : apă (40 : 2 : 10)

Nivelul solventului în tancul cromatografic trebuie să depășească cu 2 cm linia de start. Migrarea solventului se realizează pînă cînd acesta a atins cealaltă margine (latură) a plăcii. Apoi plăcile sînt uscate la 90°C timp de 5—10 minute sau la temperatura camerii timp de 12 ore. Urmează developarea în cea de-a doua dimensiune, după care placa este din nou uscată la 90°C timp de 20 minute.

Evidențierea zonelor cromatografice separate: se realizează cu reactivul ninhidrină-colidină (v. pag. 37). Cu acest reactiv limita inferioară de detectabilitate pentru unii aminoacizi este :

0,05 μg alanină, acid aspartic și valină ;

0,1—0,2 μg izoleucină, serină și arginină ;

0,3—0,5 μg pentru histidină, lizină, metionină și tirozină.

Separarea aminoacizilor pe straturi de Silicagel G

Silicagel G (Kieselgel G) este un produs de policondensare a acidului ortosilicic, grupările active fiind resturile hidroxil. Acest tip de gel are în compoziție un liant — $CaSO_4$ 1/2 H_2O în diferite cantități, de la 5% la 15%.

Prepararea stratului: într-un pahar conic se introduc 25 g silicagel G și 40 ml apă distilată. Se agită energic timp de 30—50 secunde, iar pasta (fără bule de aer) se întinde pe plăcile de sticlă. Suprafața stratului este activată la 120°C timp de 5—10 minute.

Cromotografierea : după aplicarea probelor (aminoacizi puri, amestec de aminoacizi) placa este introdusă în tancul cromatografic. Migrarea continuă pînă cînd frontul solventului atinge partea superioară a plăcii. Apoi placa este uscată la 90°C timp de 5—10 minute. Developarea se realizează monodimensional cu unul din următoarele amestecuri de solvenți :

96% etanol : apă (70 : 30)

n-propanol : apă (70 : 30)

n-butanol : acid acetic : apă (80 : 20 : 20)

Evidențierea zonelor cromatografice separate : se realizează utilizînd metoda detectării policromatice (v. pag. 37).

Separarea derivaților dinitrofenil a aminoacizilor

DNP — aminoacizii se separă mai bine pe straturi de silicagel.

Prepararea stratului cromatografic: aproximativ 25—30 g silicagel este suspendat în 60—65 ml apă distilată și omogenizat bine. Această cantitate este suficientă pentru a acoperi 5 plăci de 20 × 20 cm, cu un strat de 0,25 mmgrosime. Dacă preparatele de silicagel conțin $CaSO_4$ (Kieselgel G), prepararea omogenatului și întinderea stratului nu trebuie să depășească 1—1,5 minute deoarece adsorbantul face priză rapid. Silicagelul fără $CaSO_4$ (Kieselgel H) formează, de asemenea, straturi stabile de 0,25 mm grosime.

Cromatografierea: DNP-aminoacizii solubili în apă pot fi separați monodimensional utilizînd solventul n-propanol : 37% NH_4OH (7 : 3), derivații fiind aplicați pe o placă cromatografică caldă (60°C) în soluție de HCl 0,5 N pentru a îndepărta acidul înainte de separarea cromatografică.

DNP-aminoacizii solubili în eter pot fi separați prin cromatografiere bidimensională. Pentru migrarea în prima dimensiune se prepară amestecul, toluen : piridină : clorhidrină : 0,8 N NH_4OH (100 : 30 : 60 :60), faza superioară fiind utilizată la migrare, iar faza inferioară este utilizată pentru îmbibarea hîrtiei de filtru care căptușește tancul cromatografic; pentru migrarea în a doua dimensiune se prepară amestecul cloroform : alcool benzilic : acid acetic (70 : 30 : 3).

Separarea peptidelor

Stratul cromatografic: pentru prepararea stratului cromatografic se recomandă Kieselgel S (Macherey-Nagel). Înainte de separare, stratul cromatografic este încălzit timp de 30 minute la 110°C, încălzirea fiind repetată între cele două developări.

Cromatografierea se realizează bidimensional. Pentru prima migrare se recomandă amestecul cloroform : metanol : 25% NH_4OH (2 : 2 : 1), iar pentru developarea pe direcție perpendiculară piridină : acid acetic : butanol : apă (40 : 14 : 69 : 25).

Experiența 12. SEPARAREA AMINOACIZILOR PE SCHIMBĂTORI DE IONI

Pentru separarea amioacizilor se utilizează rășini schimbătoare de cationi, puternic acide, cu grupări sulfonil, de tipul produselor Dowex 50 și Zeo-Karb 225. Stein și Moore au separat cantitativ toți aminoacizii dintr-un hidrolizat proteic, prin eluție fracționată de pe o coloană de Dowex 50. Aminoacizii la pH mai mici decît punctele lor izoelectrice există sub formă de cationi și dacă pH hidrolizatului este ajustat sub 3 se observă ieșirea în bloc (excluderea) a tuturor acestor aminoacizi. Ceilalți sînt eluați selectiv de pe coloană cu un gradient crescător de pH. Ordinea lor de apariție în eluate este în principal datorată constanțelor de disociere și într-un grad mai mic dimensiunilor lor. Temperatura, de asemenea, afectează viteza lor de eluție.

În tabelul următor prezentăm o serie de rășini schimbătoare de ioni, indicîndu-se tipul, ionul grefat pe matrice, capacitatea de schimb ionic precum și firma producătoare.

Rășina	Tipul	Capacitatea mechiv./ml rășină	Firma
Dowex 50×12	cationit puternic SO_3^-	2,3	Dow-Chemical Co
Dowex 50× 8	„ „	1,7	„
Dowex 50× 4	„ „	1,2	„
Dowex 50× 2	„ „	0,7	„
Amberlite IR—120	„ „	1,9	Rohm & Haas Co.
Dowex 1—× 8	anionit puternic $-\overset{+}{N}(CH_3)_3$	3,2	Dow-Chemical Co.
Dowex 1—× 4	„ „	3,5	„
Dowex 1—× 2	„ „	„	„
Amberlite IRA—400	„ „	1,0	Rohm & Haas Co
Amberlite IRC—50	cationit slab rășină acrilică	—	„
Zeo-Karb 226	„ „	3,5	Permutit Co.

În acest experiment, trei aminoacizi — unul acid, unul neutru și celălalt bazic — sînt separați pe o coloană de Zeo-Karb 225 în forma Na^+. Deoarece acești aminoacizi au constante de disociere foarte diferite (Asp — $pK_1 = 1{,}995$; Ala — $pK = 2{,}348$ și Lys — $pK_3 = 10{,}79$) eluția poate fi realizată cu două soluții cu diferite valori de pH.

Reactivi și soluții

— soluție tampon citrat 50 mM pH 4,2
— soluții 0,1 M și 2 M de NaOH
— soluție 2 M de HCl
— soluție 2 M de HCl
— Zeo-Karb 225 (50—100 mesh, 4,5% agent de înrețelare, forma Na^+)
— soluție de ninhidrină neutră (0,2 g în 100 ml acetonă)
— soluție de ninhidrină acidă (0,2 g în 90 ml acetonă, 5 ml acid acetic glacial, 5 ml apă)
— se prepară trei probe prin tratarea a (i) 1 ml acid aspartic 1% (ii) 1 ml alanină 1% și (iii) 1 ml lizină 1% în HCl 0,1 M cu 2 ml soluție tampon citrat
— soluție tampon acetat 0,1 M pH 5

Modul de lucru

Prepararea coloanei. Se suspendă aproximativ 10 g rășină în 25 ml HCl 2 M și amestecul obținut se omogenizează prin agitare. Se decantează acidul și se spală rășina de trei ori cu apă distilată. Apoi se adaugă 25 ml NaOH soluție 2 M, se agită suspensia și se îndepărtează lichidul prin decantare. Se spală rășina cu apă distilată pînă cînd apele de spălare sînt neutre, în final rășina se resuspendă în aproximativ 50 ml soluție tampon citrat pH 4,2.

Se pregătește o coloană de sticlă cu un volum de aproximativ 25 ml, care este prevăzută la bază cu un tub de sticlă efilat, legat prin intermediul unui tub de cauciuc. Viteza de spălare a coloanei este reglată

cu un robinet. La baza coloanei se aplică un postament din vată de sticlă. Se montează coloana în poziție verticală și se toarnă suspensia de rășină. Se agită rășina cu o baghetă de sticlă pentru a scoate bulele de aer din stratul cromatografic și pentru o împachetare uniformă. Se lasă rășina să sedimenteze și se îndepărtează excesul de lichid, evitînd a lăsa coloana uscată. Se formează un strat cromatografic cu o înălțime de 8 cm.

Se pipetează cu grijă soluție tampon citrat și se lasă ca să pătrundă în stratul de rășină pînă cînd rămîne la suprafață un strat de soluție de 1 cm înălțime. Pentru a evita disturbarea suprafeței rășinii, se plasează un mic disc de hîrtie de filtru. Se spală coloana cromatografică cu soluție tampon citrat pînă cînd pH eluantului este 4,2. Se lasă să treacă un exces de tampon prin coloană pînă cînd suprafața lichidului a atins discul de hîrtie.

Aplicarea probei și colectarea de fracții. Se pipetează cu grijă un volum de 0,3 ml soluție din amestecul celor trei aminoacizi (cîte 0,1 ml din fiecare) și se lasă ca proba să pătrundă în stratul de rășină. Se spală cu soluție tampon citrat pH 4,2. Se colectează 25 probe a cîte 2 ml fiecare, viteza de eluție fiind de 1 ml/minut. Eluția aminoacizilor este urmărită prin testul ninhidrinei. La 1 ml eluat se adaugă 1 ml soluție tampon acetat pH 5 și 1 ml soluție neutră de ninhidrină, se încălzește 10 minute pe o baie de apă la fierbere. O colorație albastră indică o reacție pozitivă.

Cu acest sistem tampon se eluează acidul aspartic și alanina. De fapt, acidul aspartic este exclus din matricea stratului cromatografic. După ce și cel de-al doilea aminoacid a fost eluat cu tampon pH 4,2 se colectează două fracții negative la reacția cu ninhidrină. Se colectează aproximativ 12—15 fracții în urma eluției cu soluția tampon citrat de pH 4,2. După îndepărtarea excesului de tampon se începe eluția cu o soluție de NaOH 0,1 M. Testîndu-se în eluate reacția cu ninhidrină acidă se constată eluția lizinei. Numărul total de fracții colectate cu soluția de hidroxid de sodiu este de 8—10.

După reacția cu ninhidrină, se citește extincția probelor la 570 nm față de apă distilată. Se trasează un grafic al extincției (pe ordonată) față de numărul probei (pe abscisă), care reprezintă curba de eluție.

Experiența 13. SEPARAREA AMINOACIZILOR PRIN ELECTROFOREZĂ

Electroforeza constituie o metodă de separare a compușilor încărcați electric sub acțiunea unui curent electric. Componentele unui amestec sînt aplicate pe o hîrtie de filtru specială, umectată într-o soluție tampon. După aplicarea unui gradient de potențial, componentele migrează în direcția și cu o viteză corespunzătoare sarcinii și mărimii lor, fracțiile individuale obținute fiind apoi vizualizate cu ajutorul unei reacții de culoare și apoi determinate cantitativ. Hîrtia de filtru poate avea dimensiuni de 20—100 cm lungime și 3—15 cm lățime. Mărimea gradientului

de potențial aplicat depinde de natura substanțelor de investigat. În general se poate aprecia că substanțele cu mase moleculare mici se separă mai bine cu gradiente de potențial înalte (50—100 V/cm lungime bandă), în timp ce substanțele cu mase mari se separă prin electroforeză în gradient scăzut de potențial (2—10 V/cm).

Separarea electroforetică a aminoacizilor din hidrolizatele proteice sau din diferite omogenate tisulare (aminoacizii liberi) se efectuează în gradiente de înalt voltaj. Aparatele utilizate pentru aces tip de elecroforeză trebuie prevăzute cu sisteme de răcire, de disipare a căldurii degajate în timpul separării. Căldura generată scade rezistența hîrtiei și crește în timp mobilitatea componentelor. Acest efect este mult scăzut în cazul electroforezei de jos voltaj. Dacă sînt menținute constante condițiile în care are loc electroforeza de la un experiment la altul, rezultatele unor separări succesive pot fi comparabile.

În prezentul experiment se va realiza separarea electroforetică a trei aminoacizi : unul acid (acidul aspartic), altul neutru (alanina) și celălalt bazic (lizina)i. Aminoacizii nu migrează la punctele lor izoelectrice ; la valori de pH mai mici decît acest punct aminoacizii posedă o sarcină pozitivă și migrează către catod, iar la pH mai mari decît pH izoelectric ei sînt încărcați negativ și migrează către anod.

Soluții și materiale

— soluție tampon pH 2,0 (100 ml acid acetic glacial + 35 ml acid formic, diluat la un volum final de 1 000 ml cu apă distilată) ;

— soluție tampon pH 4,3 (10 ml acid acetic glacial + 10 ml piridină, diluat la un volum final de 1 000 ml cu apă distilată) ;

— soluție tampon pH 6,5 (100 ml piridină + 4 ml acid acetic glacial, diluat la un volum final de 1 000 ml cu apă distilată) ;

— soluție tampon pH 8,6 (9,13 g H_3BO_3, 1,44 NaOH se dizolvă în apă distilată pînă la un volum final de 1000 ml) ;

— soluție tampon pH 10 (0,952 g borax, 0,35 g NaOH se dizolvă în apă distilată pînă la un volum final de 93 ml) ;

— soluție tampon pH 11,5 (5,3 g carbonat de sodiu anhidru dizolvat în 1 000 ml apă distilată) ;

— soluție neutră de ninhidrină (0,2 g în 100 ml acetonă) ;

— soluție acidă de ninhidrină (0,2 g în 90 ml acetonă), la care se adaugă 5 ml acid acetic glacial și 5 ml apă) ;

— soluție alcalină de ninhidrină (0,2 g în 100 ml etanol, la care se adaugă 0,5 ml KOH M) ;

— soluții 0,1% de acid aspartic, alanină și lizină ;

— hîrtie Whatman No. 1.

Modul de lucru

Se realizează separări electroforetice succesive, pe hîrtie Whatman No. 1, în cele șase soluții tampon. După ce se marchează linia de start, pe hîrtia Whatman se aplică patru spoturi : (i) — Asp ; (ii) — Ala ; (iii) — Lys și (iv) amestec din cei trei aminoacizi, în volume egale. Se umple

cuva cu soluția tampon, se suspendă cele două capete ale hîrtiei în aceasta și se umectează pentru a lăsa curentul electric să treacă. Se conectează aparatul la 200—250 V, migrarea fiind condusă cel puțin patru ore. După deconectarea aparatului, se marchează anodul și catodul, apoi hîrtia se usucă într-un curent de aer cald. Se pulverizează cu soluția de ninhidrină, se încălzește la 105°C, cînd spoturile sînt developate.

Cînd separarea electroforetică este realizată la pH 2,0 developarea se realizează cu soluția alcalină de ninhidrină, cînd separarea se face la pH 4,6 sau 8 — cu soluția neutră de ninhidrină, iar cînd migrarea decurge la pH 10 sau 11,5 reacția se realizează cu soluția acidă.

Se notează mobilitățile electroforetice ale celor trei aminoacizi la diferite valori de pH, determinîndu-se aproximativ punctele lor izoelectrice. Se indică valoarea de pH la care se obține cea mai bună separare.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

CAPITOLUL III

METODE DE SEPARARE ȘI FRACȚIONARE A EXTRACTELOR PROTEICE

Separarea și purificarea unei anumite proteine dintr-un extract proteic total este una dintre cele mai importante părți din cercetarea biochimiei proteinelor. Metodele chimiei organice și tehnicile fizicii pentru separarea moleculelor sînt inadecvate, biochimia avînd un arsenal metodologic propriu pentru fracționarea unui amestec de compuși cu proprietăți similare.

Valorile extreme de pH și temperatură, solvenții organici, utilizarea unor agenți de oxidare și reducere trebuie evitate în procedeele de separare a biomoleculelor, pentru conservarea activității lor biologice. Tehnicile experimentale descrise în acest capitol utilizează condiții blînde în separarea biomoleculelor, bazate pe diferențe în proprietățile fizice ale acestora, ca de exemplu : mărimea, forma, masa, sarcina netă globală, solubilitatea, absorbția pe diferite suporturi cromatografice, etc.

3.1. DIALIZA

Această metodă permite separarea biomoleculelor mari de cele mici printr-o membrană semipermeabilă, care permite trecerea numai a compușilor cu mase moleculare mici. Practic, într-un sac de dializă imersat într-un exces de solvent apos este introdus amestecul de separat (Figura 3.1.). Biomoleculele mici trec prin membrana semipermeabilă în lichidul exterior pînă cînd este atins un echilibru. Prin dializă față de un fluid curgător sau prin schimbarea repetată a solventului apos se poate realiza îndepărtarea totală a moleculelor mici din amestec.

Cel mai des utilizat material pentru dializă este celofanul. Sînt accesibile comercial și tuburi speciale pentru dializă, livrate de *Visking Division of Union Carbide.*

Prepararea sacului de dializă. Din tubul special pentru dializă este tăiată o porțiune de lungime convenabilă care se umectează cu apă. Deoarece materialul din care sînt făcute aceste tuburi conțin urme ale unor compuși cu sulf, ioni metalici și chiar urme ale unor enzime se recomandă tratarea acestuia cu o soluție alcalină de EDTA (Na_2CO_3 1% — EDTA 1 mM), timp de 30 min, pe o baie de apă la fierbere. După acest

tratament, tubul este spălat cu apă distilată și închis la un capăt. Dializa este realizată în cele mai bune condiții utilizînd aceste tuburi, proaspăt preparate, deoarece în timp devin susceptibile atacului microorganismelor. Pentru păstrarea lor, se recomandă ca în soluție să fie introduse urme de acid benzoic.

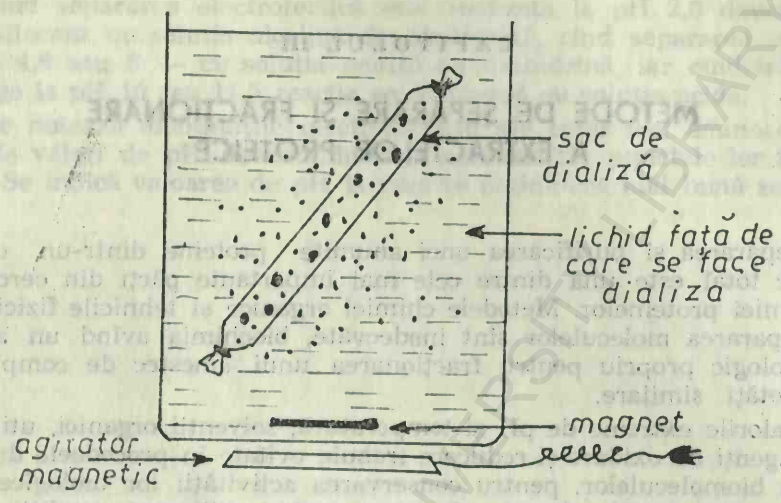


Figura 3.1. — Schema unui aparat de dializă

Limitele de permeabilitate a tuburilor de dializă. În condițiile utilizării tuburilor *Visking* și a unei dialize peste noapte, membranele sînt permeabile pentru compuși a căror masă moleculară este sub 30 000 — valoare limită care variază însă cu natura pretratamentului acestora.

Solventul de dializă. Cea mai mare viteză de dializă se înregistrează față de apa distilată, deși pentru stabilizarea biomoleculelor cercetate este necesară utilizarea unei soluții apoase cu pH și tărie ionică definită.

În timpul dializei, datorită proceselor de osmoză apa intră în tubul de dializă, care trebuie să fie suficent de umplut pentru a nu provoca diluarea excesivă a conținutului. Cu toate acestea, cînd dializa este efectuată de o soluție concentrată a unui compus inert și cu o masă moleculară mare, apa iese din tub în exterior și se poate realiza o reducere a unui volum de 200 ml la cîțiva mililitri, în aproximativ 24 ore.

Parametri fizici de dializă. Viteza procesului de dializă este cu atît mai mare cu cît *temperatura* este mai ridicată. La temperaturi ridicate, vîscozitatea solventului este mică și viteza de difuzie este crescută. Cu toate acestea, dializa soluțiilor de proteine cu activitate biolo-

gică (enzime, anticorpi, hormoni), de acizi nucleici etc. trebuie realizată la temperaturi de 4°C pentru a evita termodenaturarea acestora.

Separarea moleculelor mari de cele mici poate fi, de asemenea, efectuată prin aplicarea unui *gradient de presiune* la nivelul membranei tubului de dializă, într-un vacuum, în locul unei anumite soluții. Procesul prin care apa și moleculele mici ies din tubul de dializă constituind un ultrafiltrat, în timp ce moleculele mari rămîn în tub concentrîndu-se, poartă denumirea de *ultrafiltrare*.

Echilibrul de membrană Donnan. În cursul separării unei soluții proteice de o soluție salină cu ajutorul unei membrane semipermeabile, proteina încărcată electric nu poate trece prin membrană, iar ionii sării care pot străbate această barieră se distribuie inegal creînd o diferență de potențial de-o parte și de alta a membranei. Acest proces, numit *efect Donnan*, prezintă inconvenientul că dacă dializa este realizată față de apă distilată, apar modificări de pH.

De exemplu, în cazul particular al unei proteine cu încărcare electrică netă negativă dizolvată într-o soluție de NaCl, supuse unei dialize față apă distilată, proteina nu poate trece prin membrană, în timp ce ionii de schimb Na^+ (Figura 3.2) dializează liber. Pentru menținerea ne-

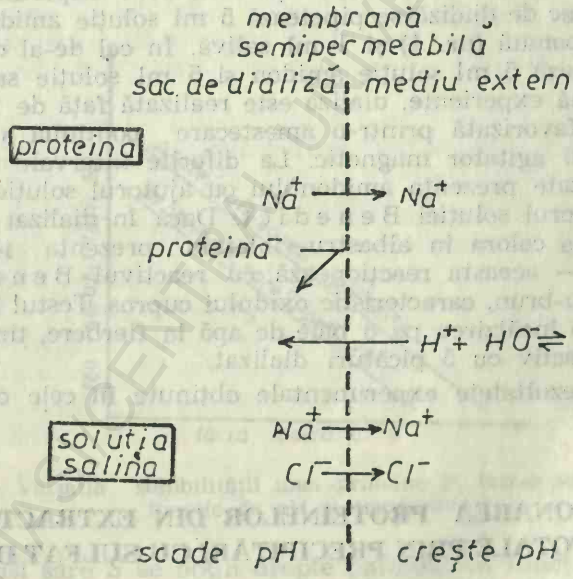


Figura 3.2. — Efectul Donnan în cazul dializei unei soluții saline proteice față de apă distilată

utralității electrice, în mediul exterior apare un exces de cationi, apa disociază și ionii de hidrogen intră în tubul de dializă. În timp ce pH mediului față de care se face dializa crește, cel din interiorul tubului de dializă scade. Pentru a evita aceste neajunsuri și deci efectul Donnan, dializa trebuie efectuată față de soluții saline mai concentrate decît 0,1 M.

Principiul metodei. Amidonul constă din două componente distincte amiloza (masa moleculară 5×10^5) și amilopectina (masa moleculară 1×10^6) care nu pot penetra printr-o membrană a unui sac de dializă. Amilaza salivară, prin acțiunea sa catalitică de hidroliză a amidonului, produce maltoză (masa moleculară 360) care poate difuza în dializat.

Reactivi și soluții necesare

1. Soluție tampon fosfat 0,02 M, pH 6,9 care conține NaCl, 0,1%;
2. Soluție de amidon solubil 2%, preparată în soluția tampon 1;
3. Soluție iod 5 mM în KI, soluție 3%;
4. Soluție Benedict (Se dizolvă 173 g citrat de sodiu și 100 g carbonat de sodiu în 800 ml apă distilată caldă. Se filtrează soluția și filtratul se aduce la 840 ml cu apă distilată. Se dizolvă 17,3 g sulfat de cupru în aproximativ 100 ml apă și se aduce la 150 ml. Se amestecă cele două soluții sub agitare).
5. Salivă;
6. Sac de dializă.

Modul de lucru. Se montează, în paralel, două experimente de dializă. În primul sac de dializă se pipetează 5 ml soluție amidon, 4 ml soluție salină tamponată (nr. 1) și 1 ml salivă. În cel de-al doilea sac de dializă se pipetează 5 ml soluție amidon și 5 ml soluție salină tamponată. În cele două experiențe, dializa este realizată față de 100 ml soluție nr. 1, fiind favorizată printr-o amestecare continuă a dializatului cu ajutorul unui agitator magnetic. La diferite intervale de timp, se testează în dializate prezența amidonului cu ajutorul soluției nr. 3 și a maltozei cu ajutorul soluției Benedict. Dacă în dializat există amidon, acesta se va colora în albastru-violet în prezența iodului, dacă există maltoză — aceasta reacționează cu reactivul Benedict dînd un precipitat roșu-brun, caracteristic oxidului cupros. Testul Benedict este realizat prin încălzirea pe o baie de apă la fierbere, timp de 5 minute, a 2 ml reactiv cu 5 picături dializat.

Se discută rezultatele experimentale obținute în cele două experiențe paralele.

3.2. FRACȚIONAREA PROTEINELOR DIN EXTRACTELE (PROTEICE TOTALE PRIN PRECIPITĂRI CU SULFAT DE AMONIU

Proteinele globulare prezintă o structură tridimensională, în care grupările polare, hidrofile sînt orientate spre exterior stabilind interacții ion-dipoli sau dipol-dipol cu moleculele apei din mediu — în timp ce grupările hidrofobe sînt orientate spre interiorul „globului proteic" alcătuind în interiorul acestuia un „miez hidrofob". În cazul *albuminelor*, interacțiile dintre grupările hidrofile și moleculele de apă sînt mai puternice decît între moleculele proteice învecinate, proprietate care conduce

la solubilizarea acestor proteine în apă. În cazul *globulinelor*, solubilizarea nu se poate realiza decît în prezența unor cantități mici de sare, cînd apar interacții între grupările hidrofile ale proteinei și ionii sării dizolvate.

În cazul unei proteine date, solubilitatea ei crește cu concentrația unei sări neutre (proces denumit în limba engleză *salting-in)*, atinge o valoare maximă, după care scade treptat pînă cînd precipită din soluție (proces denumit în limba engleză *salting-out)*. Fiecare proteină, în funcție de structura ei, precipită la o anumită concentrație dintr-o sare — deci teoretic este posibilă *precipitarea fracționată*, treptată, a proteinelor dintr-un amestec și deci separarea lor *.

Între solubilitatea S și tăria ionică μ a unei soluții saline, există relația matematică :

$$\log S = \beta - K_s \cdot \mu$$

unde K_s este *constanta de precipitare*, caracteristică pentru o anumită proteină și pentru o sare neutră cu care a fost realizată precipitarea. Relația poate fi reprezentată grafic (Figura 3.3)într-un sistem de axe rectangulare, pe ordonată indicînd log *S*, iar pe abscisă tăria ionică μ. Se obțin drepte a căror pante permit calcularea valorii K_s și care intersectează ordonata într-un punct egal cu β. Pentru aceeași proteină *P* și

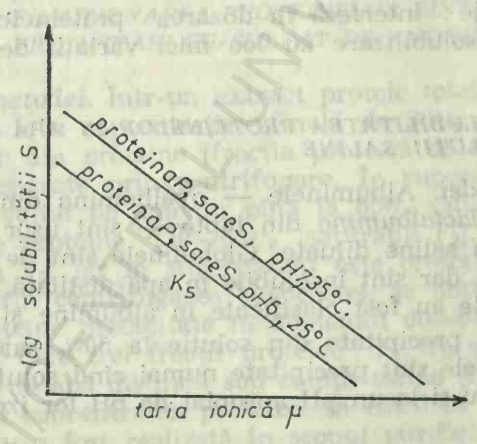


Figura 3.3. — Variația solubilității unei proteine P, într-o soluție salină — în funcție de pH și temperatură

pentru aceeași sare *S* se obțin drepte paralele, în funcție de pH și temperatura la care are loc precipitarea. De aceea, în experimentele de precipitare fracțională este necesară menținerea constantă a pH și temperaturii.

---

* *Unele expresii englezești sînt date în paranteze cu scopul de a ușura consultarea și înțelegerea corectă de către studenți a bibliografiei de specialitate din revistele de profil biochimic și biologic.*

Precipitarea proteinelor cu autorul concentrațiilor mari de sare se datorește faptului că ionii sării îndepărtează mare parte din moleculele de apă care în mod obișnuit hidratează suprafața proteinelor, fenomen care conduce în final la precipitarea acestora din soluție. *Fenomenul de precipitare este reversibil.* Prin reluarea precipitatului într-un volum limitat de apă, acesta se redizolvă — semn că nu a fost alterată structura terțiară a macromoleculei proteice.

Pentru ca o sare neutră să fie utilizată ca agent de precipitare fracționată a unui amestec de mai multe proteine, aceasta trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

— să prezinte o mare solubilitate în apă, pentru a permite obținerea unei game largi de concentrații la care să precipite diferențiat proteinele din amestec ;

— prin dizolvarea sării în mediul apos să nu aibă loc procese exoterme, care pot termodenatura proteinele sau provoca variații de pH ;

— sarea nu trebuie să interacționeze chimic cu proteine, ceea ce înlesnește separarea ei ulterioară din precipitatele proteice.

Dintre sărurile utilizate curent în precipitările fracționale ale proteinelor amintim $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, Na_2SO_4 NaCl etc. Sulfatul de amoniu este cel mai des utilizat agent de precipitare fracționată în chimia proteinelor, fiind o sare deosebit de solubilă (70,6g la 100 ml, la 0°C) și manifestînd un efect protector asupra multor proteine cu funcții biologice, ca de exemplu enzimele. Utilizarea sulfatului de amoniu prezintă și unele dezavantaje : interferă în dozarea proteinelor prin metoda Lowry, iar prin solubilizare au loc mici variații de temperatură și de pH.

Experiența 15. SOLUBILITATEA PROTEINELOR ÎN APĂ DISTILATĂ ȘI ÎN SOLUȚII SALINE

Principiul metodei. Albuminele — ovalbumina din albușul de ou, *serum albumina* și *lactalbumina* din lapte — sînt ușor solubile în apă distilată și în soluții saline diluate. Globulinele sînt de asemenea solubile în soluții saline, dar sînt insolubile în apă distilată. Pe baza acestei proprietăți, proteinele au fost clasificate în albumine și globuline.

Globulinele sînt precipitate din soluție la 50% saturație cu sulfat de amoniu. Albuminele sînt precipitate numai cînd soluția este saturată în sulfatul de amoniu și la un pH apropiat de pH lor izoelectric.

Reactivi și soluții necesare

1. Soluția NaCl 0,15 M ;
2. Soluția saturată de sulfat de amoniu ;
3. Reactivi pentru determinarea proteinelor prin metoda Lowry (v. Experiența 52) ;
4. ouă, lapte.

Modul de lucru. Dintr-un ou de găină, se separă albușul care este reluat în 200 ml apă distilată. Conținutul se agită, cu ajutorul unui agitator magnetic cînd albuminele rămîn în soluție, iar globulinele preci-

pită. Se centrifughează suspensia la 3.000 g, timp de 10 minute, se păstrează supernatantul (fracția *A* albuminică) iar sedimentul este reluat într-un volum minim de NaCl 0,15 M (fracția *G* globulinică). Cele două fracții sînt analizate din punct de vedere al concentrației proteice, utilizînd metoda Lowry (Experiența 52). Să presupunem că în fracția *A* am determinat o concentrație proteică de x mg/ml, iar în fracția *G* — y mg/ml. Dacă multiplicăm valoarea x cu 200 se obțin X mg albumine la 200 ml suspensie, iar dacă multiplicăm y cu volumul de soluție NaCl 0,15 M cu care am reluat precipitatul se obține Y mg globuline din 200 ml suspensie. Considerînd $X + Y = 100$ se poate calcula compoziția procentuală de albumine și globuline din albușul oului de găină.

Se îndepărtează prin centrifugare grăsimile dintr-un volum cunoscut de lapte. La laptele degresat se adaugă un volum egal de soluție saturată de sulfat de amoniu, amestecul fiind omogenizat cu ajutorul unui agitator magnetic. Suspensia este centrifugată la 3 000 g, timp de 10 minute — albuminele sînt regăsite în supernatant (fracția *A*), iar globulinele precipitate sînt reluate și dizolvate într-un volum minim de soluție NaCl 0,15 M (fracția *G*). Cele două fracții proteice obținute din lapte sînt analizate din punct de vedere al concentrației proteice, utilizînd metoda Lowry. Similar, se calculează compoziția procentuală a laptelui în albumine și globuline.

Experiența 16. FRACȚIONAREA PROTEINELOR DINTR-UN EXTRACT PRIN PRECIPITĂRI CU SULFAT DE AMONIU

Principiul metodei. Într-un extract proteic total se introduce sulfat de amoniu pînă la o concentrație finală de 30% din saturație, care precipită o parte din proteine (fracția proteică de 0—30% saturație — F_1), ce pot fi separate prin centrifugare. În supernatant este crescută concentrația în sulfat de amoniu pînă la 60% saturație, cînd precipită o altă fracție de proteine (30—60% saturație F_2). După centrifugare se reține fracția F_2, iar în supernatant este crescută saturația în sare pînă la 90%. Prin centrifugarea suspensiei, se obține o a treia fracție proteică F_3 (proteine precipitate în domeniul 60—90% saturație în sulfat de amoniu). Cele trei fracții proteice : F_1, F_2 și F_3 sînt reluate în volume minime de apă distilată sau soluții saline și analizate din punctul de vedere al concentrației proteice. În cazul în care fracționarea cu sulfat de amoniu a fost realizată în scopul purificării unei proteine cu funcție biologică, de exemplu a unei enzime prezente în extractul inițial, cele trei fracții sînt analizate și din punctul de vedere al capacității catalitice respective.

Reactivi și soluții necesare

1. Extract proteic total (se omogenizează într-un omogenizator cu cuțite tip „waring blendor" 1 g țesut cu 10 ml apă distilată, extracția proteinelor fiind realizată timp de o oră prin staționarea suspensiei la 4°C, după care se procedează la o centrifugare, timp de 15 minute la 3 000 g, și se păstrează supernatantul) ;

2. Sulfat de amoniu cristalizat ;

3. Reactivi pentru determinarea proteinelor prin metoda Lowry (v. Experiența 52).

Modul de lucru. Saturația extractului proteic în sulfat de amoniu se realizează prin adăugarea unei cantități de sare solidă, conform nomogramei Dixon (Figura 3.4). Să considerăm că începem fracționarea cu 100 ml extract proteic total. Se păstrează 2 ml extract pentru dozarea proteinelor, iar în 98 ml se adaugă 17,15 g sulfat de amoniu pentru a atinge 30% saturație în această sare. După dizolvarea sării, proces facilitat prin agitarea suspensiei, se perfectează precipitarea prin staționare

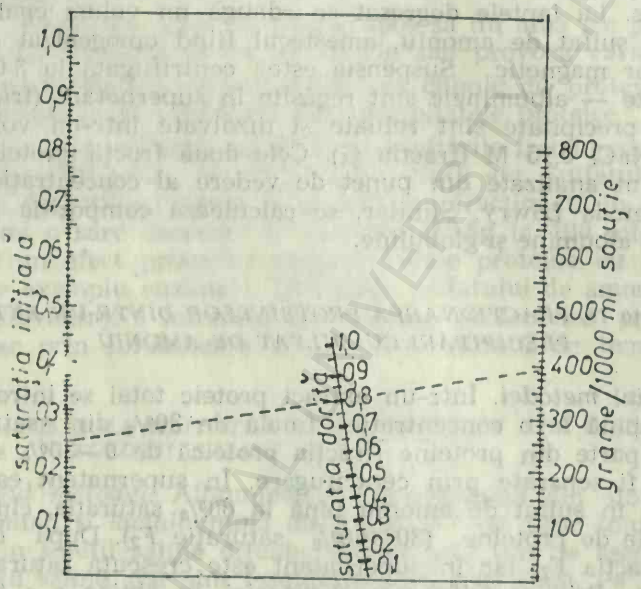


Figura 3.4. — Nomograma Dixon

la 4°C, timp de 30 minute. Suspensia este centrifugată la 3 000 g timp de 15 minute, proteinele precipitate (fracția F_1) sînt reluate în 25 ml apă și dozate prin metoda Lowry .În supernatant (volum 100 ml) se adugă 19 g $(NH_4)_2SO_4$, care se dizolvă prin agitare. După 30 minute, fracția F_2 a proteinelor precipitate în domeniul de saturație 30—60% se separă prin centrifugare. Precipitatul este reluat în 25 ml, iar în soluție este determinată concentrația proteică. La un volum de 100 ml supernatant se adaugă 21,5 g sulfat de amoniu, iar după dizolvarea sării și perfectarea precipitării (staționare la 4°C timp de 30 minute) se procedează la centrifugarea suspensiei, timp de 15 minute la 10 000 g. Supernatantul (care reprezintă o soluție salină saturată 90% în sulfat de amoniu) se aruncă, iar precipitatul,

care reprezintă fracția F_3 (a proteinelor precipitate în domeniul de saturație 60%—90%) este reluat în aproximativ 25 ml apă distilată. De asemenea, în fracția F_3 este dozată concentrația proteică prin metoda Lowry.

Rezultatele experimentale obținute în urma dozării proteinelor sînt redate într-un tabel de tipul :

Fracția	Volum (ml)	Proteina (mg ml)	Proteina totală (mg)
Extract proteic total	100 ml	a	100 a
Fracția F_1	25 ml	b	25 b
Fracția F_2	25 ml	c	25 c
Fracția F_3	25 ml	d	25 d

Urmează să determinăm randamentul fracționării :

Dacă 100 a 100%
25 $(b+c+d)$ . . . . . x%

Metoda este utilizată pentru purificarea unor enzime, anticorpi, hormoni proteici etc. Pentru aceasta, atît în extractul total cît și în fiecare fracție proteică, este testată activitatea biologică a proteinei care urmează a fi purificată. Dacă de exemplu, activitatea biologică testată este găsită numai în extractul proteic total și în fracția F_2, fracțiile F_1 și F_3 sînt aruncate.

3.3. FRACȚIONAREA PROTEINELOR DIN EXTRACTELE PROTEICE TOTALE PRIN PRECIPITĂRI CU SOLVENȚI ORGANICI

Solvenții organici (acetona, metanolul, etanolul, cloroformul) precipită proteinele din soluție datorită efectului lor de micșorare a constantei dielectrice a mediului *(D)*. Mărimea acestei constante fizice este invers proporțională cu tăria interacțiilor de tip electrostatic *(E)* dintre două sarcini Q_1 și Q_2, conform binecunoscutei ecuații a lui Coulomb :

$$E = \frac{Q_1 \cdot Q_2}{D \cdot r^2}$$

unde r este distanța dintre cele două particule încărcate electric.

Moleculele proteice sînt polielectroliți, care în apă—solvent cu o constantă dielectrică mare (aproximativ 80) se găsesc în soluție. Acest mediu apos micșorează forțele de atracție dintre sarcinile de semn opus

de la suprafața moleculelor proteice. Adăugînd treptat un solvent organic, contanta dielectrică scade, forța de atracție dintre moleculele proteice

eter D = 4,1
etanol D = 25,0
metanol D = 32,0
acetonă D = 20,7

crește în mod corespunzător, acestea se agregă prin interacții electrostatice și precipită din soluție (Tabelul 3.1.).

Tabelul 3.1.

Constantele dielectrice ale diferitelor soluții de solvenți organici

Constanta dielectrică	Metanol	Etanol	Acetona
	% greutate solvent în apă, la 20°C		
80	0	0	0
70	22	18	18
60	42	34	34
50	62	51	49
40	82	68	64
30	100	88	81
25		100	
21			
20			100

În cazul particular al unui amestec din două specii moleculare proteice, diferite, care prezintă o încărcare electrică și o distribuție a sarcinilor la suprafața structurilor tridimensionale dstincte, precipitarea lor se va realiza diferențiat la diferite constante dielectrice ale mediului și deci la diferite concentrații procentuale ale solventului organic utilizat. Deci crescînd treptat concentrația în solvent organic în amestecul bicomponent proteic, ele vor precipita pe rînd, fiind posibilă separarea lor.

Cînd sarcina electrică a celor două proteine este similară, ele vor precipita la aceeași concentrație în solvent și deci nu va fi posibilă separarea lor. În această situație, prin modificarea pH sau și a tăriei ionice a mediului se pot realiza diferențieri în sarcina electrică globală a celor două proteine din amestec și deci precipitări fracționate. Pentru acest motiv este necesar a indica pH și tăria ionică a mediului care a fost supus unei precitări fracționate cu un solvent organic.

Acțiunea precipitată a solvenților organici este realizată nu numai prin scăderea constantei dielectrice a mediului, ci și prin efectul dezhidratant asupra moleculelor proteice. Moleculele solventului organic interacționează cu moleculele apei care hidratează macromoleculele proteice prin interacții ion-dipol. Deoarece interacția moleculelor de solvent organic cu apa este exotermă toate operațiunile de precipitare se efectuează la temperaturi scăzute, sub 0°C.

Experiența 17. FRACȚIONAREA PROTEINELOR DINTR-UN EXTRACT PRIN PRECIPITĂRI CU ACETONĂ

Principiul metodei. Într-un extract proteic total se pipetează acetonă pînă concentrația în solvent organic (v/v) ajunge la 30%, operație în urma căreia precipită o primă fracție de proteine — F_1, ușor de separat prin centrifugare. La supernatant se adaugă o nouă cantitate de acetonă, concentrația finală în solvent organic fiind 60%. Suspensia este centrifugată, precipitatul reprezintă o a doua fracție de proteine — F_2, iar în supernatant este crescută concentrația în acetonă pînă la 90%. După centrifugare, se reține precipitatul, care reprezintă ultima fracție — F_3. Cele trei fracții sînt solubilizate prin reluare în volume cunoscute de apă distilată și analizate din punct de vedere al concentrației proteice prin metoda Lowry.

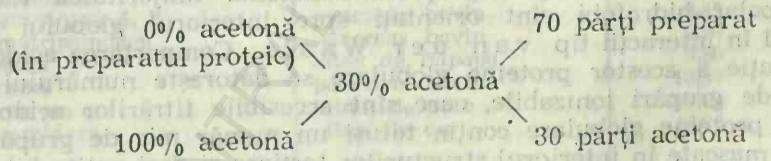
Reactivi și soluții necesare

1. Extract proteic total — preparat ca la Experiența 49.
2. Acetonă P.A.

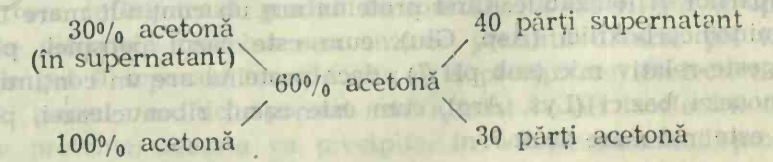
Reactivi pentru determinarea proteinelor prin metoda Lowry. (v. Experiența 52).

Modul de lucru

Să considerăm că începem fracționarea cu 100 ml extract proteic total. Se păstrează 2 ml extract pentru dozarea proteinelor, iar în 98 ml se adaugă 42 ml acetonă, calculul volumului de acetonă adăugat fiind făcut prin regula de trei simple :



Precipitarea este realizată pe o baie cu ghiață și în prezența unui amestec refrigerator de săruri, încît să fie menținută constantă o temperatură de —20°C. După ce extractul proteic total a fost răcit, se adaugă acetonă picătură cu picătură, sub agitare continuă. După adăugarea întregii cantități de acetonă, suspensia este păstrată la —20°C, timp de 30 minute. Proteinele precipitate la 30% acetonă (v/v) — *fracția* F_1, sînt separate prin centrifugare la 4 000 g timp de 15 minute ,iar în supernatant este crescută concentrația în solvent organic pînă la 60%. De exemplu, la un volum de supernatant de 140 ml se adaugă 105 ml acetonă, calculul volumului de solvent organic adăugat făcîndu-se similar :



Precipitarea este realizată în aceleași condiții descrise mai sus. Prin centrifugare la 4 000 g timp de 15 minute, se separă *fracția* F_2 (proteinele precipitate în domeniul de concentrații 30—60% acetonă — v/v), iar în supernatant este crescută concentrația în solvent organic pînă la 90 %(280 ml supernatant cu 840 ml acetonă). După perfectarea precipitării, se separă prin centrifugare (4 000 g/15 minute) *fracția* F_3 (proteinele precipitate în domeniul de concentrații 60—90% acetonă).

Cele trei fracții proteice : F_1, F_2 *și* F_3 sînt reluate în volume minime de apă distilată sau soluții saline și analizate din punctul de vedere al concentrației proteice, utilizînd metoda Lowry (v. Experiența 52). În cazul în care fracționarea cu acetonă a fost realizată în scopul purificării unei proteine cu funcție biologică, de exemplu a unei enzime prezente în extractul inițial, cele trei fracții sînt analizate și din punctul de vedere al capacității catalitice respective.

Rezultatele experimentale obținute în urma dozării proteinelor vor fi redate într-un tabel, similar cu cel prezentat în cadrul Experienței 16. Se va calcula, similar și randamentul fracționării.

3.4. FRACȚIONAREA PROTEINELOR DINTR-UN EXTRACT PRIN PRECIPITARE IZOELECTRICĂ

Studii de difracție a raxelor *X* prin cristale ale unor proteine globulare au arătat că aproape toți radicalii *R* ionizabili aparținînd resturilor de aminoacizi —CO—CH—NH— din structura lor sînt dispuși spre
|
R
exterior formînd o suprafață polară-hidrofilă. Majoritatea radicalilor *R* nepolari-hidrofobi sînt orientați spre interiorul globului proteic, intrînd în interacții tip van der Waals. Comportarea acido-bazică în soluție a acestor proteine globulare se datorește numărului relativ mare de grupări ionizabile, care sînt accesibile titrărilor acido-bazice. Unele proteine globulare conțin totuși un număr mic de grupări ionizabile mascate în interiorul structurilor terțiare și deci netitrabile acido-bazic. Deoarece diferitele proteine globulare prezintă structuri primare deosebite și comportarea lor acido-bazică variază de la o specie moleculară la alta.

La pH izoelectric, suma sarcinilor pozitive a unei proteine globulare este egală cu suma sarcinilor negative, macromolecula nu prezintă o sarcină globală netă, dispar repulsiile electrostatice între moleculele vecine ale aceleași specii proteice și ele precipită din soluție. La pH izoelectric proteinele nu migrează în cîmp electric. Valoarea pH izoelectric al unei anumite proteine globulare este funcție de numărul și pK grupărilor *R* ionizabile. Cînd proteina are un conținut mare în acizi monoaminodicarboxilici (Asp, Glu), cum este cazul pepsinei, pH izoelectric este relativ mic (sub pH 7) ; dacă proteina are un conținut mare în aminoacizi bazici (Lys, Arg), cum este cazul ribonucleazei, pH izoelectric este mai mare decît 7.

În tabelul 3.2. prezentăm valorile pH izoelectric pentru o serie de proteine și enzime.

Tabelul 3.2.

Valorile pH izoelectrice ale unor proteine și enzime

Specia moleculară	Sursă biologică	pH izoelectric
Pepsina	stomac de porc	1,0
Ribonucleaza *T*	*Aspergillus oryzae*	2,9
Fosfataza alcalină	*E. coli*	4,5
Ovalbumina	albuș de ou	4,6
Pirofosfataza	drojdie	4,75
L-asparaginaza	*E. coli*	4,90
Albumina serică	ser	4,90
Alcool dehidrogenaza	drojdie	4,90
Superoxid dismutaza	eritrocite bovine	4,95
β-lactoglobulina	lapte	5,20
Catalaza	ficat bovin	5,40
Alcool dehidrogenaza	ficat de cal	5,40
Uricaza	ficat de porc	6,30
γ_2-globulina	ser	6,69
Hemoglobina	sînge	6,80
Mioglobina	mușchi	7,00
Peroxidaza	hrean	7,20
Elastaza	pancreas de porc	8,50
Tripsinogen	pancreas bovin	9,30
Ribonucleaza *A*, *B*	pancreas bovin	9,45
Chimotripsinogen	pancreas bovin	9,50
Papaina	latex de *Papaya*	9,60
Tripsina	pancreas bovin	10,50
Citrocrom c	inimă de porc	10,65
Muramidaza	albuș de ou	11,00

Curba de titrare a unei proteine indică semnul și mărimea sarcinii nete la un anumit pH. La o valoare de pH superioară punctului izoelectric, o proteină va avea o sarcină electrică netă negativă și în cîmp electric va migra către anod. Sub pH izoelectric, proteina va avea o sarcină netă pozitivă și va migra către catod. Atît curbele de titrare cît și pH izoelectric se pot modifica substanțial în prezența sărurilor neutre, care influențează gradul de ionizație a diferitelor grupări *R*. Deoarece diferitele proteine sau enzime prezintă diverse pH izoelectrice, ele pot fi separate una de alta prin precipitare izoelectrică. Cînd pH unui amestec multicomponent este ajustat la pH izoelectric al unei anumite proteine, aceasta va precipita, în soluție rămînînd proteinele cu pH izoelectric mai mari sau mai mici decît acesta.

Experiența 18. IZOLAREA CAZEINEI DIN LAPTE

Principiul metodei. Cazeina este principala proteină a laptelui, găsindu-se într-o concentrație de 35 g/litru. În realitate ea este un amestec de mai multe proteine, care au un rest seril esterificat cu acid ortofosforic. Asemenea tuturor proteinelor, cazeina este insolubilă la pH ei izoelectric (pH 4,8) — proprietate pe care se bazează prezentul procedeu de izolare a cazeinei din lapte. Cazeina este, de asemenea, insolubilă în etanol, ceea ce permite îndepărtarea ușoară a lipidelor.

Reactivi și materiale

1. Soluție tampon acid acetic/acetat sodic 0,2 M, pH 4,6 ;
2. Eter etilic.
3. Etanol 95% (v/v).
4. Lapte.

Modul de lucru. Într-un vas de 500 ml termorezistent se toarnă 100 ml lapte și se încălzește la 40°C. Sub agitare, se adaugă 100 ml soluție tampon acetat și se aduce temperatura amestecului la 40°C. Se ajustează pH amestecului, dacă este necesar, la valoarea 4,8 cu ajutorul uneia din componentele soluției tampon. Se răcește suspensia la temperatura camerii și se lasă să stea timp de 5 minute, după care se filtrează prin mai multe straturi de tifon. Se spală precipitatul de mai multe ori cu volume mici de apă, apoi se reia în aproximativ 30 ml etanol. Suspensia se filtrează pe o pîlnie Büchner, iar precipitatul se spală cu un amestec de volume egale de etanol și eter. În final, precipitatul se spală cu 50 ml eter, sub vid. Urmele de solvent din preparat sînt îndepărtate prin presarea cazeinei între două coli de hîrtie de filtru. După uscarea preparatului, cazeina este cîntărită și se calculează randamentul separării, ținînd seama de faptul că 100 ml lapte, teoretic, conțin 3,4 g cazeină.

3.5. FRACȚIONAREA PROTEINELOR PRIN TERMOPRECIPITARE

Peste 40°C, majoritatea proteinelor devin instabile și încep să se denatureze, precipitînd ireversibil din soluție. Acest procedeu permite izolarea enzimelor termostabile, în condiții în care restul proteinelor denaturate precipită.

Practic, amestecul proteic este încălzit la 50—60°C, timp de 10—15 minute, după care se răcește brusc la 0—4°C. Proteinele termodenaturate, precipitate ,sînt îndepărtate prin centrifugare. În supernatant se testează activitatea specifică a enzimei termostabile.

Experiența 19. DETERMINAREA PROCENTUALĂ A PROTEINELOR DENATURATE LA 60°C

Principiul metodei. Se realizează un extract proteic total, în care proteinele sînt precipitate prin denaturare la temperatura de 60°C. După

îndepărtarea precipitatului prin centrifugare, în supernatant este dozată concentrația proteică. Se determină conținutul procentual al proteinelor denaturate termic.

Reactivi și materiale

1. Extract proteic total, preparat ca în Experiența 1.
2. Reactivi pentru determinarea proteinelor prin metoda Lowry (v. Experiența 52).
3. Baie de apă, termostatată — reglată la 60°C.

Modul de lucru

Să considerăm că începem precipitarea a 10 ml extract proteic total. Se pipetează 2 ml extract pentru dozarea proteinelor prin metoda Lowry, iar restul de 8 ml sînt pipetați într-o eprubetă termorezistentă și incubați 15 minute la 60°. După răcirea bruscă a suspensiei, prin centrifugare (3000 g timp de 15 minute) sînt îndepărtate proteinele termodenaturate. În supernatant se determină concentrația proteică.

Să presupunem că în extractul proteic total se determină o concentrație proteică de x mg/ml, iar în supernatant — de y mg/ml. Cantitatea de proteine denaturate termic, exprimată în miligrame, se determină astfel :

$$8\ (x—y)$$

iar procentual, aplicînd formula :

$$(x—y) \cdot 100.$$

3.6. FRACȚIONAREA PROTEINELOR PRIN PRECIPITARE CU SĂRURI ALE METALELOR GRELE

Cationii metalelor grele ca Hg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Ag^{+}, Au^{+}, Pt^{4+} etc. precipită proteinele, în mediu alcalin. Precipitarea este datorată faptului că sarcinile negative de la suprafața proteinelor sînt neutralizate de cationii mari. Adesea, acești ioni denaturează proteina deoarece reacționează cu grupările SH ale acesteia, formînd sulfuri.

Experiența 20. PRECIPITAREA PROTEINELOR CU CATIONI AI METALELOR GRELE

Principiul metodei. La pH $\geqslant$ 7, proteinele sînt încărcate negativ, iar adiția unui ion metalic încărcat pozitiv neutralizează sarcinile proteinelor care precipită din soluție. Precipitarea proteinelor cu săruri ale metalelor grele este realizată la pH neutru, deoarece în mediu alcalin există pericolul precipitării hidroxizilor metalici. Precipitatul este solubil într-un exces din soluția respectivă, deoarece excesul de ioni conferă o sarcină pozitivă, stabilizantă, macromoleculei proteice.

Reactivi și soluții

1. Proteine (albumină, cazeină, gelatină — 0,5% dizolvate în NaOH soluție 0,1% sau NaCl 0,15 M ;
2. Săruri ale metalelor grele (sulfat de cupru, acetat de plumb și azotat mercuric) — soluții 0,1 M.

Modul de lucru. La 2 ml soluție proteică se adaugă 3—5 picături dintr-o soluție a unei sări a unui metal greu. Se urmărește precipitarea și redizolvarea precipitatului la adăugarea unui exces din soluția 2.

3.7. PRECIPITAREA CU REACTIVI ACIZI

Acizii tricloracetic, sulfosalicilic, picric, tanic, tungstic, fosfomolibdenic etc., precipită proteinele. Precipitarea este probabil datorată neutralizării sarcinii pozitive a proteinei (majoritatea proteinelor, în soluții acide au o structură cationică) cu un anion voluminos. Acest tip de precipitare poate fi datorat și denaturării la valori extrem de acide ale mediului de reacție.

Experiența 21. PRECIPITAREA UNOR PROTEINE CU ANIONI COMPLECȘI

Principiul metodei. Anionii complecși au o sarcină negativă mare care neutralizează o proteină încărcată pozitiv, precipitînd-o din soluție. Reactivi acizi sînt deosebit de eficace în precipitarea proteinelor la valori acide de pH.

Reactivi și soluții

1. Proteine, ca la punctul 1 al Experienței 49.

2. Reactivi acizi : acid sulfosalicilic 20%, acid picric soluție saturată, acid tanic 10% și acid tricloracetic 20%.

Modul de lucru. Se adaugă 5 picături de reactiv acid la 1—2 ml soluție proteică. Se urmărește precipitarea proteinei din soluție, precum și efectul adăugării unui exces de reactiv acid. Se urmărește efectul alcalinizării proteice (prin adăugarea unei soluții diluate NaOH) asupra precipitării proteinelor.

3.8. CROMATOGRAFIA DE ADSORBȚIE

Termenul de *adsorbție fracțională* este dat procedeului în care cantități mici de adsorbant sînt adăugate succesiv și îndepărtate prin centrifugare, pînă cînd proteina luată în studiu este complet adsorbită pe gel. Pentru realizarea adsorbției, preparatul proteic trebuie amestecat cu adsorbantul timp de 10—15 minute. În cazul în care proteina respectivă este adsorbită pe gel, supernatantul care conține celelalte proteine contaminante este îndepărtat. Proteina studiată, adsorbită pe gel, poate fi eluată de pe acest material printr-o simplă spălare energică sub jet de apă distilată, soluții tampon sau soluții tampon care conțin 10% sulfat de amoniu. Se eluiază în porțiuni mici, pînă cînd eluentul nu mai conține proteină.

Există posibilitatea ca proteina studiată să rămînă neadsorbită în soluție, în timp ce gelul a adsorbit impuritățile și unele proteine nedorite.

În scopuri practice, adsorbanții pot fi clasificați în *adsorbanți anhidri* și *hidratați*. Adsorbanții hidratați sînt mai eficace avînd o suprafață de contact mai mare, dar nu filtrează cu o viteză conve-

nabilă pentru a-i face utilizabili pe coloane cromatografice. Prin *învechirea* gelurilor hidratate scade suprafața lor totală și puterea adsorbantă, dar crește selectivitatea. De asemenea, prin învechire sînt stabilizate starea fizică și gradul de hidratare al gelului în scopul asigurării reproductibilității rezultatelor. Gelurile de fosfat de calciu, hidroxilapatită și alumină Cγ sînt cele mai reprezentative geluri de adsorbanți hidratați.

Prepararea aluminei Cγ. O soluție fierbinte de 340 g sulfat de amoniu și aluminiu în 500 ml apă este tratată cu 3,25 litri reactiv sulfat de amoniu — amoniac (100 g sulfat de amoniu și 215 ml amoniac 20%) la 60°C. Amestecul este agitat puternic 1/4 oră la 60°C pentru perfectarea precipitării după care este diluat pînă la 20 litri și supernatantul este îndepărtat prin decantare. Spălarea cu apă a precipitatului, urmată de decantare, este repetată de cîteva ori. Pentru a îndepărta orice urmă de sulfat de aluminiu bazic, în timpul celei de a patra spălări se adaugă 40 ml amoniac, soluție 20%, după care spălarea precipitatului continuă cel puțin cîteva zile. Transformarea completă în formă γ poate fi confirmată, după cîteva săptămîni, prin testul încălzirii cu amoniac, care permite a se face distincția între formele C. Alumna Cα este transformată în forma Cγ prin fierbere în prezența unei soluții de amoniac 10% rezultînd o pudră albă de compoziție $Al_2O_3 \cdot 3H_2O$. Forma Cβ nu se va transforma, deși conținutul ei în apă este sub 27%. În general, gelul de alumină Cγ nu trebuie utilizat decît după trecerea a cel puțin trei luni de la preparare.

Prepararea gelului de fosfat de calciu. 150 ml soluție de clorură de calciu (132 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ per litru) este diluată la aproximativ 1 600 ml cu apă de robinet și amestecată sub agitare cu 150 ml soluție fosfat trisodic (142 g $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ per litru). Amestecul este adus la pH 7,4 cu acid acetic diluat și precipitatul este spălat de 3—4 ori prin decantare cu volume mari de apă (15—20 litri). Precipitatul este în final spălat cu apă distilată.

Prepararea gelului de hidroxilapatită. Doi litri soluție $CaCl_2$ 0,5 M și doi litri soluție Na_2HPO_4 0,5 M sînt amestecați într-un vas prin picurare, cu o viteză de 120 picături/minut. Brușita precipitată este spălată cu patru litri de apă distilată, de patru ori decantată, resuspendată în patru litri de apă distilată și fiartă cu 100 ml NaOH 40%, timp de o oră. Precipitatul este spălat iarăși de patru ori cu apă distilată; apele de spălare sînt îndepărtate prin decantare și apoi se adaugă soluție tampon pe bază de fosfați de sodiu 0,01 M, pH 6,8 și amestecul este încălzit pînă începe să fiarbă. După decantare, se adaugă din nou tampon, suspensia se fierbe timp de 5 minute. Precipitatul este fiert cu tamponul pe bază de fosfați de sodiu 0,01 M pH 6,8 timp de 15 minute și de două ori cu tampon fosfat 0,001 M, timp de 15 minute. Hidroxilapatita este în final suspendată într-o soluție tampon fosfat 0,001 M pH 6,8.

Experiența 22. PURIFICAREA LACTAT DEHIDROGENAZEI

Principiul metodei

Prepararea lactat dehidrogenazei din drojdia de bere se realizează prin absorbții fracționale pe geluri de alumină γ și fosfat de calciu.

Reactivi și soluții necesare

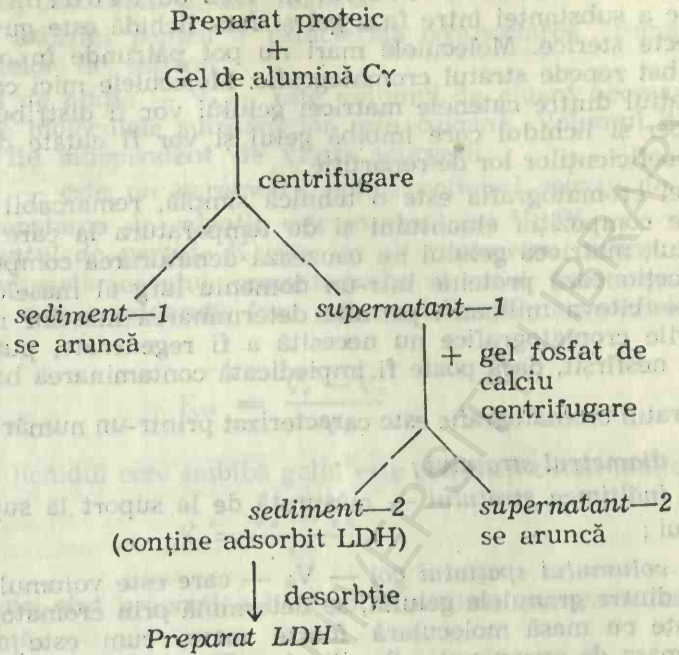
1. Autolizat de drojdie (se încălzesc 650 g drojdie proaspătă la 37°C, în prezența a 40 ml toluen ; se incubează o oră la 37°C sub agitare ocazională ; se adaugă 30 ml apă, se incubează din nou 45 minute la 37°C, după care se adaugă 650 ml apă, ajustîndu-se pH la 7,5—8,0 cu KOH 2 N ; după ce suspensia este lăsată să stea 48 ore la temperatura camerii, se centrifughează la 8 000—10 000 g, păstrîndu-se supernatantul) ;
2. Gel de alumină Cγ ;
3. Gel de fosfat de calciu ;
4. Soluție tampon K_2HPO_4—KH_2PO_4 66 mM, pH 7 ;
5. Soluția tampon 4 conținînd $(NH_4)_2 SO_4$ 10% ;
6. Reactivi pentru dozarea activității lactat dehidrogenazei (v. Experiența 63) ;
7. Reactivi pentru dozarea proteinelor prin metoda spectrofotometrică (v. Experiența 49).

Modul de lucru. 75 ml autolizat de drojdie sînt tratați cu 24 ml gel de alumină Cγ. Se amestecă timp de 15 minute preparatul proteic cu gelul, după care urmează o centrifugare la 8 000 g/15 miunte. Se dozează concentrația proteică în autolizat și în supernatant. De asemenea, se determină activitatea lactat dehidrogenazei în cele două preparate. Se constată că pe gel au fost absorbite proteine inactive din punct de vedere catalitic, iar în supernatant se regăsește 95% din activitatea inițială.

La 81 ml supernatant se adaugă 25 ml gel fosfat de calciu, se omogenizează cu ajutorul unei baghete de sticlă 15 minute, după care se centrifughează la 8 000 g/15 minute. În supernatant se dozează concentrația proteică și activitatea lactat dehidrogenazică. Se constată că numai 5% din activitate a rămas în supernatant, deci 95% din enzimă se află adsorbită pe gelul de fosfat de calciu.

Se spală sedimentul de gel de patru ori cu cîte 10 ml soluție tampon 4. Eluția enzimei se realizează prin spălarea gelului de două ori cu 10 ml și odată cu 5 ml soluție 5. În cei 25 ml se dozează concentrația proteică (prin metoda spectrofotometrică, (v. Experiența 49) și activitatea lactat dehidrogenazică (v. Experiența 63).

Procedeul de purificare al lactat dehidrogenazei (LDH) poate fi reprezentat schematic astfel :



Datele experimentale obținute în urma dozărilor de concentrații proteice și activități LDH sînt prezentate într-un tabel de tipul :

Etapa	Volum ml	Proteină mg/ml	Activitatea LDH		Factor de purificare
			U/ml	U/mg	
Autolizat	. .	. .	. .	. .	. .
Supernatant-1	. .	. .	. .	. .	. .
Preparat LDH	. .	. .	. .	. .	. .

3.9. GEL CROMATOGRAFIA

Gel cromatografia este o metodă de separare a polipeptidelor și proteinelor bazată pe dimensiunile substanțelor. Stratul cromatografic este constituit din particule mici, între care există un spațiu liber prin care curge lichidul eluant. Diferitele substanțe care străbat stratul cromatografic vor suferi efecte de partiție între faza staționară (lichidul care îmbibă gelul, sau chiar gelul însuși) și faza lichidă (lichidul de eluție). Gelul are o structură macromoleculară, tridimensională, insolubilă și este îmbibat cu aceeași soluție cu care se face și eluția. Gel cromatografia separă proteinele conform mărimii moleculare : moleculele mari trec primele

prin stratul cromatografic, cele mai mici sînt reținute — putîndu-se stabili o corelație strînsă între masa lor moleculară și volumul de eluție. Conform modelului elaborat în 1962 de F l o d i n, coeficientul de partiție a substanței între faza gel și faza lichidă este guvernat exclusiv de efecte sterice. Moleculele mari nu pot pătrunde în ochiurile rețelei și străbat repede stratul cromatografic. Moleculele mici care au acces în tot spațiul dintre catenele matricei gelului vor fi distribuite între lichidul liber și lichidul care îmbibă gelul și vor fi eluate diferențiat conform coeficienților lor de repartiție.

Gel cromatografia este o tehnică simplă, remarcabil de insensibilă față de compoziția eluantului și de temperatura la care are loc experimentul, matricea gelului nu cauzează denaturarea compușilor de separat, fracționează proteine într-un domeniu larg al maselor moleculare : 1 000 — cîteva milioane, permite determinarea maselor moleculare, iar straturile cromatografice nu necesită a fi regenerate, putînd fi reutilizate la nesfîrșit, dacă poate fi împiedicată contaminarea bacteriană.

Stratul cromatografic este caracterizat printr-un număr de parametri :

— *diametrul stratului ;*

— *înălțimea stratului* — măsurată de la suport la suprafață de sus a gelului ;

— *volumului spațiului gol* — V_o — care este volumul de lichid din spațiul dintre granulele gelului, se determină prin cromatografierea unei substanțe cu masă moleculară foarte mare, cum este *Blue Dextran 2 000* (masa de aproximativ 2 milioane). V_o variază cu metoda de împachetare a coloanei și cu presiunea la care se face operația ;

— *volumul total al stratului* — V_t — se poate calcula utilizînd formula volumului unui cilindru sau se poate determina separat ;

— *volumul gelului din strat* — V_x — este definit ca :

$$V_x = V_t - V_o$$

— *volumul spațiului interior* — V_i este volumul lichidului din interiorul particulelor de gel :

$$V_i = V_x - m_g \cdot V_g$$

unde m_g este greutatea matricei de gel din strat.

V_g este volumul matricei gelului. Volumul spațiului interior mai poate fi redat de formula :

$$V_i = m_g \cdot W_R$$

unde W_R — este capacitatea de reținere a apei (în limba engleză — *water regain).*

Parametrii utilizați pentru a caracteriza eluția sînt :

— *viteza de eluție,* uzual exprimată în ml/min sau ml/oră. Cînd experiențele sînt realizate pe coloane cu diametre diferite, pentru com-

parație, viteza de eluție se exprimă la suprafața transversală în stratul cromatografic — ml/oră/cm² sau cm/oră.

— *presiunea hidrostatică* din coloană.

Parametrii utilizați pentru a caracteriza comportarea cromatografică a substanțelor de separat :

— *volumul de eluție* — V_e — este volumul de eluant necesar pentru a transpune moleculele substanțelor prin coloană. Volumul de eluție trebuie să fie independent de viteza scurgerii.

— V_e / V_o — este un parametru numit *volumul relativ de eluție*

— R — constanta de retenție este inversul lui V_e / V_o

— *Coeficientul de partiție* K este un alt parametru utilizat în caracterizarea comportamentului cromatografic al unei substanțe. Dacă faza staționară este considerată faza gel, se definește un coeficient de partiție :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_x}$$

iar dacă numai lichidul care îmbibă gelul este considerat fază staționară :

$$K_d' = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

Cei doi parametri sînt proporționali și pot fi utilizați pentru a caracteriza o substanță.

Parametrii utilizați pentru caracterizarea gelurilor sînt :

— *limita de exclusiune,* care reprezintă cele mai mari mase moleculare (sau raze Stoke) care mai sînt reținute pe stratul cromatografic ;

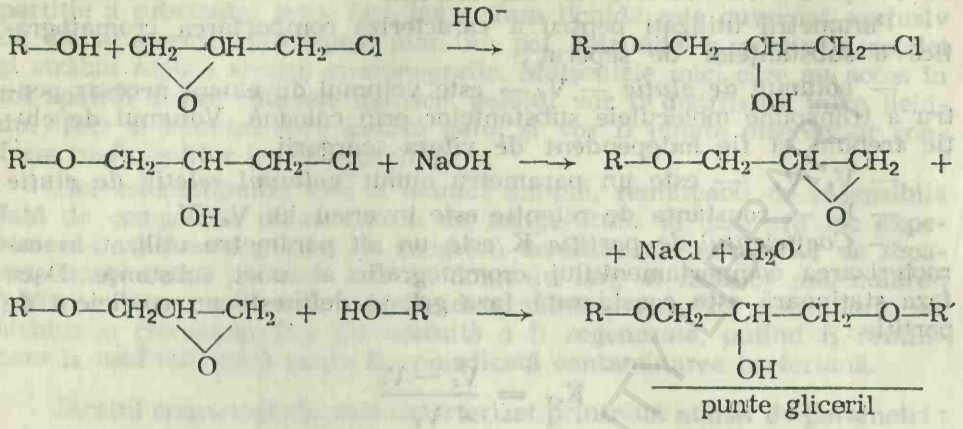
— *capacitatea gelului de reținere a apei* — W_R care reprezintă numărul de mililitri apă sau soluție apoasă care îmbibă un gram gel uscat.

— diametru particulei de gel.

Pentru ca un fel să fie utliizabil în cromatografie, trebuie să îndeplinească următoarele condiții : matricea lui trebuie să fie inertă chimic, gelurile trebuie să fie stabile în timp și în domenii largi de pH și temperatură, să aibă un conținut scăzut de grupări ionizate, mărimea particulelor și distribuția pe mărimi a acestora să fie riguros controlată, etc.

Gelurile pe bază de dextran — Sephadex. Aceste geluri au la bază un polizaharid — dextranul, produs al biosintezei microorganismului *Leuconostoc mesenteroides,* care în stare nativă are o masă moleculară de aproximativ 10^6 daltoni, conține 90—95% legături α-1,6-glucozidice și 5—10% legături α-1,3-glucozidice. Reactivitatea dextranului

este asigurată de cele trei resturi hidroxil per rest de glucoză, care interacționează cu epiclorhidrima, în mediu alcalin, formînd o rețea tridimensională, catenele fiind legate prin punți gliceril :



Dacă dextranul inițial este un produs ușor solubil în apă, compusul nou format, cu structură tridimensională, este total insolubil în apă. În soluții apoase, rețeaua tridimensională se îmbibă, se umflă, reținînd lichidul în ochiurile de rețea. Gradul de umflare este determinat de gradul de înrețelare (% epiclorhidrină).

Sephadex este accesibil în tipuri diferite prin gradul lor de înrețelare și deci prin capacitatea lor de îmbibare : G—10, G—15, G—25, G—50, G—75, G—100, G—150 și G—200 — numărul după litera G este vaoarea W_R multiplicată de 10 ori (Tabelul 2.3). Sephadex G—10 — G—50 au grade mari de înrețelare, se umflă puțin și sînt utilizate pentru fracționarea peptidelor și polipeptidelor și pentru desalefierea proteinelor și polipeptidelor. Sephadex G-75—G-200 fracționează proteine, au un grad de înrețelare scăzut, pori mari și se îmbibă puternic.

Pentru fiecare tip de Sephadex există diferite grade de dimensiuni ale particulelor :

— *gradul „superfine"*, cu un diametru al particulelor cuprins între 10—40 μ utilizabil pentru cromatografia în strat subțire și în cromatografia pe coloană de înaltă rezoluție — eluția realizîndu-se numai sub presiune ;

— *gradul „fine"*, cu un diametru al particulelor cuprins între 40—80 μ pentru obținerea unor separări pe coloană cu rezoluții bune — eluția realizîndu-se liber dar cu viteze mici ;

— *gradul „medium"*, cu un diametru al particulelor cuprins între 50—150 μ, utilizabil pentru separări modeste, dar cu viteze de eluție mari ;

— *gradul „coarse"*, cu un diametru de 100—300 μ permite o separare grosieră, cu viteze de eluție mari — se utilizează frecvent în procedeul „batch".

Uscarea și îmbibarea Sephadex-ului sînt procese reversibile. Îmbibarea pulberei uscate se face cu soluția de eluție timp de 3—72 ore (în funcție de tipul de Sephadex) la temperatura camerii, sau 1—3 ore la

Tabelul 3.3.

Date tehnice ale gelurilor Sephadex

Denumirea	Diametrul particulei uscate (μ)	Domeniul de fracționare Masa moleculară Proteine globulare	Dextrani	Rațînerea apei (ml g gel uscat)	Volum strat (ml/g gel uscat)	Timp minim de îmbinare (ore)	
						la temp. camerei	la fierbere
Sephadex G-10	40—120	700	700	1,0±0,1	2— 3	3	1
Sephadex G-15	40—120	1.500	1.500	1,5±0,2	2,5— 3,5	3	1
Sephadex G-25 „coarse“	100—300						
Sephadex 25 „medium“	50—150	1.000— 5.000	100— 5.000	2,5±0,2	4— 6	3	1
Sepsadex G-25 „fine“	20— 80						
Sephadex G-25 „superfine“	10— 40						
Sephadez G-50 „coarse“	100—300						
Sephadex G-50 „medium“	50—150	1.500— 30.000	500— 10.000	5,0±0,3	9—11	3	1
Sephadex G-50 „fine“	20— 80						
Sephadex G-50 „superfine“	10— 40						
Sephadex G-75	40—120	3.000— 70 000	1.000— 50.000	7,0±0,5	12—15	24	3
Sephadex G-75 „superfine“	10— 40						
Sephadex 100	40—120	4.000—150.000	1.000—100 000	10,0±1,0	15—20	72	5
Sephadex G-100 „superfine“	10— 40						
Shepadex G-150	40—120	5.000—400.000	1.000—150.000	15,0±1,5	20—30	72	5
Sephadex G-150 „superfine“	10— 40						
Sephadex G-200	40—120	5.000—800.000	1.000—200.000	20,0±2,0	30—40	72	5
Sephadex G-200 „superfine“	10— 40						

Datele sînt preluate după „Sephadex — Gel filtration in theory and practice“, prospect de la Pharmacia Fine Chemicals

100°C — cînd se realizează o deaerare și o sterilizare a suspensiei de gel. Spălarea materialului cromatografic îmbîcsit prin utilizări repetate se realizează cu ajutorul unei soluții NaOH 0,24 M.

Gelurile pe bază de poliacrilamidă — Bio-Gel. Aceste geluri sintetice sînt formate prin copolimerizarea acrilamidei cu metilen-bis-acrilamida. Prin varierea raportului monomer : comonomer se pot obține geluri cu porozități și capacități de îmbibare diferite. Bio-Rad livrează 10 tipuri de Bio-Gel-uri : P-2, P-4, P-6, P-10, P-30, P-60, P-100, P-200 și P-300. Numărul pus după litera majusculă indică limita de exclusiune pentru gel, multiplicată cu 1 000 pentru peptide și proteine globulare (Tabelul 3.4). Proprietățile cromatografice ale Bio-Gelurilor sînt similare celor descrise pentru Sephadex.

Experiența 23. DESALEFIEREA SOLUȚIILOR PROTEICE PE COLOANE DE SEPHADEX G—25

Principiul metodei. Soluții proteice saline sînt cromatografiate pe coloane umplute cu Sephadex G—25 : proteinele sînt complet excluse (Kd=0) în timp ce sărurile cu masă moleculară mică pătrund în particulele gelului (Kd=1) și imigrează lent prin stratul cromatografic. Metoda desalefierii cu Sephadex este superioară dializei, fiind mult mai rapidă, ideală pentru proteinele denaturabile prin dializă și nu conduce la diluarea probei.

Reactivi și soluții necesare

1. Sephadex G—25 ;

2. soluție proteică salină : într-un extract proteic total se introduce sulfat de amoniu pînă la o concentrație finală de 30% saturație, care precipită o fracție proteică, ce poate fi îndepărtată prin centrifugare ; se păstrează supernatantul (v. și Experiența 49).

Modul de lucru. Pentru desalefierea a 100 ml soluție proteică sînt necesari 25 g Sephadex G—25 solid (volumul soluției proteice care urmează a fi desalefiată trebuie să reprezinte 1/5 din volumul stratului cromatografic).

Sephadex-ul solid este suspendat în apă distilată și lăsat să se îmbibe 3 ore la temperatura camerii. Cînd gelul începe să sedimenteze, se îndepărtează prin decantare suspensia care conține particule mai fine. Operația se repetă de mai multe ori pînă cînd supernatantul este clar. Se prepară o coloană cromatografică (1 cm×20 cm) prin turnarea suspensiei de gel (Figura 3.5) în coloană. Sedimentarea suspensiei de gel, realizată sub acțiunea forței gravitaționale, este facilitată prin deschiderea robinetului de ieșire al coloanei, menținînd o viteză de spălare a coloanei foarte mică.

După ce înălțimea stratului cromatografic a devenit constantă, se trece soluția proteică prin coloană. Eluarea coloanei se face cu apă dis-

tilată. Se colectează fracții de cîte 5 ml în care se determină densitatea optică la 280 nm (pentru a se face o apreciere a conținutului proteic) și se testează prezența anionului SO_4^{2+} prin reacția cu o soluție de $BaCl_2$.

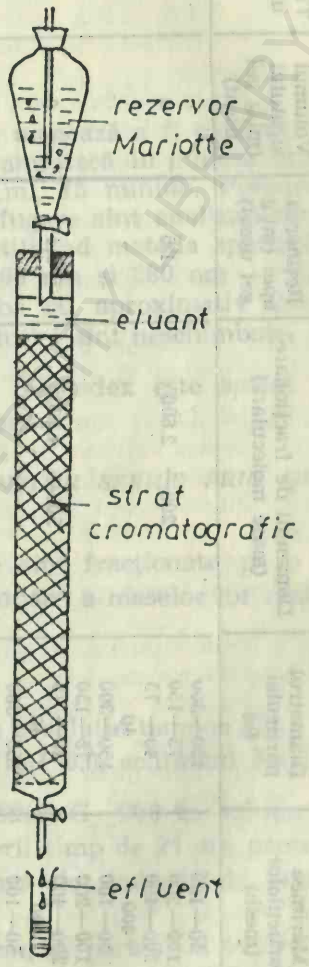


Figura 3.5. — Coloană cromatografică

Observații. Se trasează o curbă de eluție, indicînd pe ordonată D.O. 280 nm iar pe abscisă numărul probei eluate sau volumul efluentului. Pe curba de eluție se vor indica și probele care dau reacție pozitivă pentru anionul sulfat.

Pentru desalefierea proteinelor se utilizează Sephadex G-25 și G-50 sau Bio-Gel P-6 și P-10. Pentru desalefierea peptidelor se recomandă Sephadex G-10 și G-15 sau Bio-Gel și P-2 și P-4.

Tabelul 3.4.

Date tehnice pentru Bio-Gel

Denumirea produsului	Mărimea particulelor (mesh)	Diametrul particulei (μ)	Domeniul de fracționare (mase moleculare)	Reținerea apei (ml/g gel uscat)	Volumul stratului (ml/g gel uscat)	Timp minim de umflare (ore la temperatura camerei)
Bio-Gel P—2	50—100 100—200 200—400 400	150—300 75—150 40— 75 40	200— 2.600	1,5	4	2— 4
Bio-Gel P—4	50—100 100—200 200—400 400	150—300 75—150 40— 75 40	500— 4.000	2,4	6	2— 4
Bio-Gel P—6	50—100 100—200 200—400 400	150—300 75—150 40— 75 40	1.000— 5.000	3,7	9	2— 4
Bio-Gel P—10	50—100 100—200 200—400 400	150—300 75—150 40— 75 40	5.000— 17.000	4,5	12	2— 4
Bio-Gel P—30	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	20.000— 50.000	5,7	15	10—12
Bio-Gel P—60	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	30.000— 70.000	7,2	20	10—12
Bio-Gel P—100	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	40 000—100.000	7,5	20	24
Bio-Gel P—150	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	50.000—150.000	9,2	25	24
Bio-Gel P—200	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	80.000—300.000	14,7	35	48
Bio-Gel P—300	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	100.000—400.000	18,0	40	48

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Experiența 24. CONCENTRAREA SOLUȚIILOR PROTEICE CU SEPHADEX

Principiul metodei. Prin tratarea soluțiilor proteice cu Sephadex solid, acesta avînd proprietăți puternic hidrofile se îmbibă cu apa din soluție și determină o concentrare a proteinei.

Reactivi și soluții

1. Soluție proteică;
2. Sephadex G—25 tip „coarse".

Modul de lucru. Soluția proteică care urmează a fi concentrată (P_1) este tratată cu Sephadex G—25 solid, se amestecă 10 minute după care omogenatul este centrifugat la 6 000 t.p.m., 15 minute. Preparatul P_1 și supernatantul (P_2) rezultat după centrifugare sînt analizați din punctul de vedere al concentrației proteice utilizînd metoda spectrofotometrică (determinarea densității optice la 260 nm și 280 nm — v. Experiența 49). 1g Sephadex G—25 se îmbibă cu aproximativ 2,5 g apă. După concentrare, pH și tăria ionică a soluției sînt neschimbate.

Observație. După folosire, gelul de Sephadex este spălat cu apă distilată, alcool etilic și eter, uscat și refolosit.

Experiența 25. FRACȚIONAREA PROTEINELOR SERICE PRIN GEL CROMATOGRAFIE

Principiul metodei. Proteinele serice sînt fracționate pe o coloană de Sephadex G—200 în ordinea descrescătoare a maselor lor moleculare.

Reactivi și soluții

1. Sephadex G—200;
2. Ser sanguin, dializat o oră față de o soluție tampon (3).
3. Soluție tampon Tris — HCl 1 M, pH 8,0, conținînd NaCl 0,2 M.

Modul de lucru. Se suspendă Sephadex G—200 în soluția tampon (3), gelul fiind lăsat la temperatura camerii timp de 24 ore pentru îmbibare. Particulele fine care nu sedimentează sînt îndepărtate prin decantări și resuspendări repetate.

Se montează o coloană de 1,8×30 cm, la partea inferioară aplicînd o rondea de material plastic. După ce se închide robinetul, coloana este umplută cu soluția tampon (aproximativ 1/3 din înălțimea ei). Se toarnă suspensia de gel, iar după cîteva minute se deschide puțin robinetul coloanei și se continuă umplerea acesteia cu suspensia de gel. Umplerea trebuie să fie continuă, pentru a evita sedimentarea gelului în straturi, precum și formarea bulelor de aer în interiorul materialului cromatografic. După ce întreaga cantitate de gel a fost pusă în coloană, se procedează la spălarea stratului cromatografic cu 2—3 volume de soluție tampon, pînă cînd înălțimea acestuia rămîne constantă.

După ce nivelul soluției tampon a atins suprafața superioară a stratului cromatografic, urmează aplicarea pe coloană a 4 ml ser, dializat o oră față de soluția tampon (3). Această operație trebuie efectuată cu multă grijă pentru a nu denivela suprafața stratului cromatografic. După ce serul a pătruns în gel urmează eluarea stratului cu aceeași soluție tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 conținînd NaCl 0,2 M. Se colectează fracții a cîte 5 ml, eluția realizîndu-se la o viteză de 20 ml/oră. În fiecare fracție — efluent se măsoară spectrofotometric valoarea densității optice la 280 nm.

Datele experimentale sînt prezentate sub forma unei *curbe de eluție*, pe ordonată indicînd densitățile optice la 280 nm, iar pe abscisă — numărul fracției efluent. Proteinele serice sînt eluate în trei picuri proteice :

picul I, constituit din proteinele cu cele mai mari mase moleculare : *macroglobulina* și *lipoproteidele ;*

picul II, constituit din proteine cu mase moleculare apropiate de cea a *γ-G-globulinei ;*

picul III, constituit din proteinele serice cu cele mai mici mase moleculare : *albumina* și *transferina.*

Observații. După terminarea fracționării, coloana de Sephadex este spălată cu cîteva volume de soluție tampon și poate fi din nou utilizată. Pentru a evita infestarea microbiană pe stratul cromatografic, se recomandă introducerea în soluția tampon eluant de mertiolat, fenol sau toluen.

3.10. CROMATOGRAFIA PRIN SCHIMB IONIC

Există două tipuri de schimbători de ioni utilizați în cromatografie : *rășini schimbătoare de ioni și schimbători de ioni pe bază de produși naturali — celuloză și dextran.*

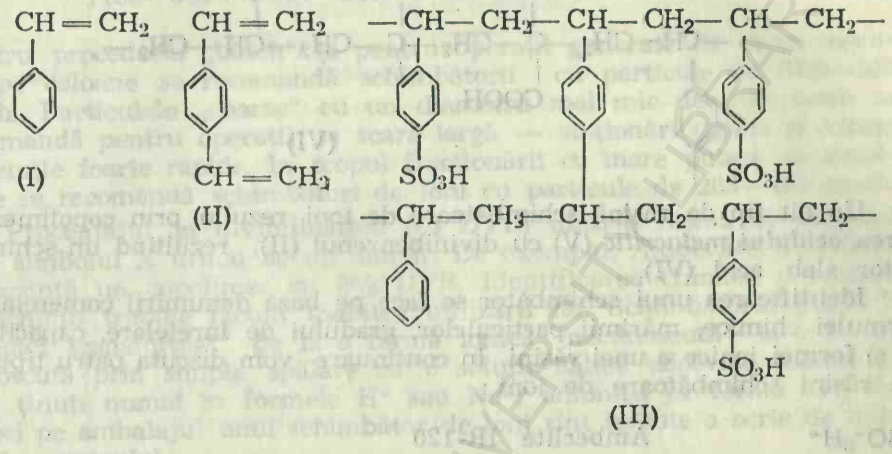
Rășinile sintetice schimbătoare de ioni sînt constituite din două părți : *o parte hidrofobă*, matricea, care este o rețea tridimensională, elastică, fixă, insolubilă în majoritatea solvenților, inertă chimic și o *parte hidrofilă*, constituită din grupări ionizate legate chimic la matrice, ioni activi, mobili care reacționează chimic. Dacă o particulă a unei astfel de rășină schimbătoare de ioni este pusă în contact cu o soluție apoasă ce conține ioni — are loc un schimb ionic : ionii din soluție înlocuiesc ușor ionii mobili ai rășinii.

Comportamentul chimic al unei rășini schimbătoare de ioni este determinat de natura grupărilor ionizate atașate la matrice, existînd două clase de schimbători ; *schimbători de cationi*, care realizează un schimb cu cationii din soluție și schimbători de anioni, care realizează un schimb cu anionii din soluție.

O rășină tipică schimbătoare de cationi este obținută prin copolimerizarea *stirenului* (I) *cu divinilbenzenul* (II). Prin polimerizare se formează inițial catene lineare de polistiren, care se leagă covalent una de alta prin punți de divinilbenzen, rezultînd o rețea hidrocarbonată tridimensională insolubilă. Dacă acidul sulfuric reacționează cu acest polimer sînt introduse grupări reactive de acid sulfonic $—SO_3^-H^+$ la ni-

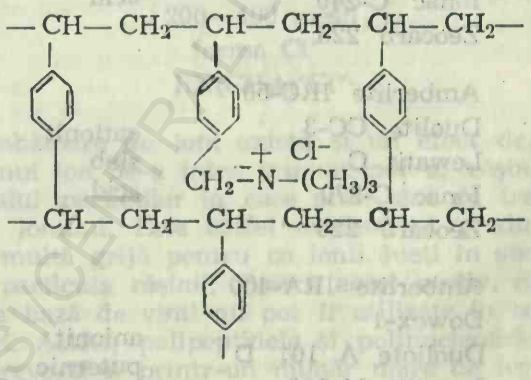
velul nucleelor benzen din polimerul stiren-divinilbenzen, formînd în final un cationit, cu ionii mobili H^+ (III).

O rășină tipică schimbătoare de anioni este preparată prin *clorometilarea* nucleelor benzen a copolimerului stirendivinilbenzen prin atașare de grupări $—CH_2Cl$ și apoi printr-o reacție a acestora cu o amină terțiară, ca *trimetil amina*.



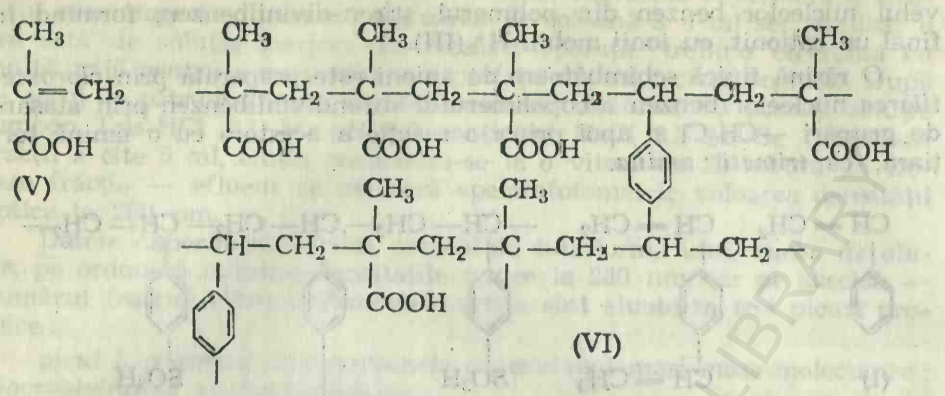
(I) (II) (III)

Se formează clorura unui puternic schimbător de anioni, un schimbător puternic bazic a cărei ioni de schimb sînt Cl^- IV).



(IV)

Rășinile pe bază de vinilbenzen au remarcabile proprietăți fizice și chimice : sînt insolubile în acizi, baze și săruri concentrate, sînt rezistente la oxidare, reducere și radiații. Ele prezintă o înaltă capacitate de schimb — deci pe matrice există multe grupări ionice funcționale. Natura chimică a grupării ionice fixate pe matrice determină și natura schimbătorului de ioni. Astfel, dacă aceste grupări sînt acizi sau baze puternic ionizate, rezultă schimbători puternic acizi sau bazici, după cum dacă aceste grupări sînt slab ionizate rezultă schimbători slab acizi sau slab bazici.



(V)

(VI)

Un alt tip de rășină schimbătoare de ioni rezultă prin copolimerizarea *acidului metacrilic* (V) cu divinibenzenul (II), rezultînd un schimbător slab acid (VI).

Identificarea unui schimbător se face pe baza denumirii comerciale, formulei chimice, mărimii particulelor, gradului de înrețelare, capacității și formei ionice a unei rășini. În continuare vom discuta patru tipuri de rășini schimbătoare de ioni :

$RSO^-_3H^+$	Amberlite IR-120 Dowex 50 W Lewatit S-100 Ionac C-240 Zeocarb 225	cationit puternic acid
$R'.COO^-Na^+$	Amberlite IRC-50 Duolite CC-3 Lewatit C Ionac C-270 Zeocarb 226	cationit slab acid
$R.CH_2.N(CH_3)_3 + Cl^-$	Amberlite IRA-400 Dowex-1 Duoliote A 101 D Lewatit M-500 Ionac A-450 Zeocarb FF	anionit puternic bazic
$(R.NHX_2)^+Cl^-$	Amberlite IR 45 Dowex 3 Duolite A-7 Lewatit MP-50 Ionac A-315 Zeocarb G	anionit slab bazic

Mărimea particulelor unui schimbător variază de la 1 μ (starea coloidală) la cîțiva milimetri și este dată în termeni de *mesh*;

diametru					
mesh	16— 20	20— 50	50—100	100—200	200—400
μ	1168—840	840—297	297—149	149— 74	74— 38

Pentru procedeele „batch" și pentru operații generale de cromatografie pe coloane se recomandă schimbătorii cu particule de 100—200 mesh. Particulele „coarse" cu un diametru mai mic de 100 mesh se recomandă pentru operații pe scară largă — staționări rapide și viteze de eluție foarte rapide. În scopul fracționării cu mare putere de rezoluție se recomandă schimbători de ioni cu particule de 200—400 mesh.

Procentajul în divinilbenzen (% DVB) dintr-o rășină se exprimă prin simbolul X urmat de un unmăr. De exemplu, Amberlite IR-120×8 reprezintă un copolimer cu 8% DVB. Identificarea chimică a ionului de schimb trebuie făcută înaintea utilizării lui. Schimbătorul poate fi complet transformat de la o formă ionică necunoscută la o formă cunoscută prin simpla spălare cu o soluție salină adecvată. Cationiții sînt ținuți numai în formele H^+ sau Na^+, anioniții în forma Cl^-. De obicei pe ambalajul unui schimbător de ioni sînt trecute o serie de date ca în exemplul:

Amberlite IRA-400 × 8
200—400 mesh
forma Cl^-
$RN(CH_3)_3^+Cl^-$

În rășinile schimbătoare de ioni există și un efect de cernere ionică. Probabilitatea unui ion de-a intra într-un por al rășinii este mică — cu excepția cazului particular în care porii sînt de trei ori mai mari decît diametrul ionului. Este astfel evident că gradul de înrețelare trebuie ales cu multă grijă pentru ca ionii luați în studiu să difuzeze liber în și din particula rășinii. Pentru acest motiv, rășinile schimbătoare de ioni pe bază de vinil nu pot fi utilizate în separarea macromoleculelor mari. Astfel, polipeptidele și polinucleotidele fiind polivalente se leagă ireversibil printr-un număr mare de legături ionice. În general se consideră că substanțele cu mase moleculare mai mari de 500 nu pot suferi reacții de schimb ionic pe aceste rășini.

Pentru substanțele cu mase moleculare mari — proteine, enzime, acizi nucleici — cromatografia trebuie realizată cu schimbători de ioni pe bază de celuloză și de dextran — care au distanțe mai mari între situsurile de schimb, fiind scăzută probabilitatea legării multiple între macromoleculă și schimbător.

Mărimea considerabilă a porilor, suprafața enormă, numărul mic de situsuri de schimb și natura lor hidrofilă fac schimbătorii pe bază de celuloză și dextran materiale excelente în separarea cromatografică a macromoleculelor. În tabelul 3.5. prezentăm principalii *schimbători pe*

bază de celuloză, indicînd gruparea ionizabilă și capacitatea de schimb. Unele proprietăți ale acestor schimbători — afinitatea pentru proteine, capacitatea de reținere a lor, proprietățile mecanice — variază cu sursa naturală de celuloză și cu procedeul de fabricație.

Tabelul 3.5.

Schimbări de ioni celulozici

Schimbător	Grupare ionizabilă	mechiv/g.
	ANIONIȚI	
AE-celuloză	Aminoetil- —O—CH_2—CH_2—NH_2	0,3—1,0
DEAE-celuloză	Dietilaminoetil- —O—CH_2—CH_2—$N(C_2H_5)_2$	0,1—1,1
TEAE-celuloză	Trietilaminoetil- —O—CH_2—CH_2—$N(C_2H_5)_3X^-$	0,5—1,0
GE-celuloză	Guanidoetil- —O—CH_2—CH_2—NH—C(=NH)—NH_2	0,2—0,5
PAB-celuloză	p-Aminobenzil —O—CH_2—C$_6$H$_4$—NH_2	
ECTEOLA--celuloză	Trietanolamină cuplată la celuloză prin punți gliceril și poligliceril	0,1—0,5
BD-celuloză	DEAE-celuloză benzoilată	0,8
BND-celuloză	DEAE-celuloză benzoilată și naftoilată	0,8
PEI-celuloză	Polietilenimină adsorbită la celuloză sau celuloză slab fosforilată	0.1
	CANTIONIȚI	
CM-celuloză	Carboximetil- —O—CH_2—COOH	0,5—1,0
P-celuloză	Fosfat —O—PO_3H_2	0,7—7,4
SE-celuloză	Sulfoetil —O—CH_2—CH_2—SO_3H	0,2—0,3

Între schimbătorii de ioni celulozici și polielectroliți se stabilesc *legături de tip electrostatic*, care disociază și se refac continuu datorită prezenței ionilor sare care concurează și ei pentru situsurile lor de sorbție. O creștere în concentrația salină mărește șansa ionilor sare de a ajunge la situsurile de sorbție, de a cîștiga competiția cu substanța de separat — ultima fiind desorbită datorită disocierii simultane a tuturor legăturilor care o țin legată de stratul cromatografic. Cu cît concentrația salină este mai mare cu atît zona cromatografică va migra mai repede. În cursul acestei eluții au loc sorbții și desorbții multiple.

Există două procedee de desorbție : *eluția în gradient* și *eluția în trepte*. Gradientul trebuie să prezinte o pantă suficient de lină pentru a permite separarea componentelor și suficient de abruptă pentru a împiedica lățirea picurilor. Pentru a obține o rezoluție maximă, panta gradientului trebuie să permită atingerea echilibrului de sorbție pe toată lungimea coloanei. În mod ideal, gradientul trebuie să elimine

complet afinitatea unui component pentru stratul cromatografic într-un punct situat de-asupra bazei inferioare a coloanei. În cadrul eluției în trepte, coloana este eluată cu mai multe soluții cu putere de eluție crescîndă. Acest ultim procedeu prezintă dezavantajul că nu permite atingerea unui echilibru de sorbție, astfel că într-un pic pot fi eluate două sau mai multe componente corespunzător intervalului în care a fost crescută puterea de eluție. Eluția treptată este totuși mult utilizată în practica de laborator deoarece este realizabilă într-un interval de timp mai scurt (condiție strict necesară în izolarea enzimelor instabile și a enzimelor proteolitice), iar componentele se obțin într-o formă mai concentrată.

În cazul particular al unei proteine, creșterea pH îi va mări sarcina electrică globală negativă (îi mărește afinitatea pentru un anionit și-i scade afinitatea pentru un cationit), iar scăderea pH îi va mări sarcina electrică absolută pozitivă, crescîndu-i afinitatea pentru cationiți. De aceea dacă lucrăm cu DEAE — celuloză, se recomandă un pH ridicat — limitat de o serie de factori care concură, printre care și stabilitatea proteinei luate în studiu, iar dacă efectuăm o cercetare cu CM-celuloză se recomandă un pH scăzut.

Metoda eluției în gradient se realizează prin creșterea continuă a concentrației saline, prin modificarea pH sau prin schimbarea concomitentă a tăriei ionice și pH.

Schimbătorii de ioni pe bază de Sephadex (Tabelul 3.6) sînt compuși organici sintetici derivați de la dextran, ce combină avantajele schimbătorilor de ioni — rășini cu cele ale schimbătorilor de ioni pe bază de celuloză : înaltă capacitatea de schimb și o adsorbție nespecifică extrem de scăzută. Catenele de dextran sînt înrețelate dînd o rețea tridimensională în care grupările funcționale ionice sînt atașate la unitățile de glucoză prin lături eterice. Schimbătorii de ioni pe bază de Sephadex sînt accesibili sub forma a două tipuri de porozități : gelurile înalt înrețelate și cu porozitate mică sînt desemnate prin indicele 25, cele cu porozitate mare — 50. Porozitatea determină gradul în care anumite substanțe sînt capabile de a difuza prin schimbătorul de ioni și deci și capacitatea accesibilă a acestuia. În general se consideră că substanțe cu mase moleculare mai mici de 10.000 pot fi separate pe tipul 25, în timp ce substanțe cu mase mai mari pot fi fracționate cu 50. Se consideră că separările pe schimbătorii de ioni pe bază de Sephadex sînt datorate parțial efectelor ionice și parțial diferențelor de mase moleculare.

Tipurile 50 se umflă mai mult decît 25, gradul de umflare depinzînd de compoziția ionică a mediului. La tării ionice scăzute, repulsia electrostatică dintre grupările fixe încărcate este maximă și schimbătorul se umflă mult. Gradul de umflare scade cu creșterea tăriei ionice datorită diminuării repulsiilor electrostatice. Variațiile de volum sînt mari la DEAE-Sephadex A-50 și CM-Sephadex C-50 — în special pînă la tărie ionică 0,1. DEAE-Sephadex A-25 și CM-Sephadex C-25 sînt mai puțin influențate de variațiile de tărie ionică a mediului.

Gradul în care un schimbător de ion este încărcat este dependent de pH. Repulsia electrostatică dintre grupările încărcate este maximă la valori de pH la care schimbătorul este total încărcat și scade cînd

grupările încărcate sînt neutralizate. Variațiile volumului cu pH sînt mai evidente la DEAE-Sephadex A-50 și CM-Sephadex C-50. QAE-Sephadex și SP-Sephadex sînt total încărcate într-un domeniu larg de pH și deci au proprietăți de îmbibare independente pe pH.

Tabelul 3.6.

Schimbări de ioni pe bază de dextran

Schimbător	Gruparea ionizabilă	Caracterizare	Ion de schimb
DEAE-Sephadex A-25 și A-50	Dietilaminoetil-	Anionit slab bazic	Cl^-
QAE-Sephadex A-25 și A-50	Dietil-(2-hidroxipropil) aminoetil	Aionit puternic bazic	Cl^-
CM-Sephadex C-25 și C-50	Carboximetil	Cationit slab acid	Na^+
SP-Sephadex C-25 și C-50	Sulfopropil	Cationit puternic acid	Na^+

Substanțele sînt legate la schimbătorul de ioni dacă au sarcini opuse acestuia, legarea fiind electrostatică și reversibilă. Proteinele fiind polielectroliți amfoteri, teoretic se pot lega la orice schimbător : cationit sau anionit. Practic, în aceste tipuri de experimente trebuie ținut seama de domeniul în care proteina este stabilă (Figura 3.6). Ținînd seama de pH izoelectric al unei proteine și de domeniul de pH în care ea este stabilă se pot face unele considerații generale :

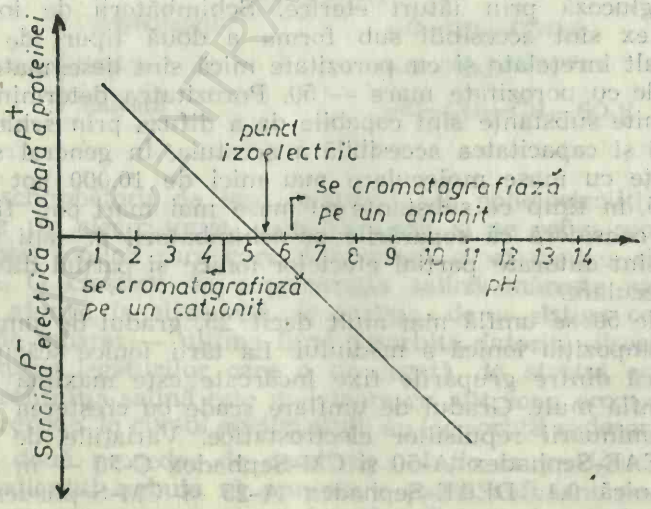


Figura 3.6. — Sarcina electrică globală a unei proteine în funcție de pH. Sînt indicate valorile de pH la care proteina cu un pH izoelectric de aproximativ 5,2 se leagă la un cationit sau la un anionit.

— dacă proteina nu este denaturată la un pH mai mare decît pH izoelectric, se recomandă separarea ei cromatografică pe un anionit : DEAE- şi QAE-Sephadex ;

— dacă proteina nu este denaturată un pH mai mic decît pH ei izoelectric, poate fi cromatografiată pe un cationit : CM- şi SP-Sephadex ;

— dacă domeniul de stabilitate este larg (o unitate pe pH peste şi sub pH izoelectric) proteina poate fi cromatografiată atît pe un cationit cît şi pe un anionit.

Este recomandabil utilizarea tampoanelor cationice Tris-HCl pentru eluarea anioniților şi a tampoanelor anionice fosfat, acetat pentru cationiți. pH şi tăria ionică a soluției tampon cu care se efectuează eluția sînt astfel alese încît inițial proteina luată în studiu să fie puternic sorbită în stratul cromatografic. pH tamponului trebuie să fie aproximativ cu o unitate de pH peste punctul izoelectric al unei proteine — pe un anionit şi cu o unitate de pH sub punctul izoelectric — pe un cationit. Substanțele încep să disocieze de pe un schimbător la aproximativ 0,5 unități de pH de la punctele lor izoelectrice — în cazul particular al unei tării ionice de 0,1.

Tăria ionică a tamponului influențează considerabil legarea şi deci capacitatea diferitelor substanțe. Ținînd seama şi de faptul că schimbătorii pe bază de Sephadex prezintă variații de volum în special la tării ionice scăzute se recomandă ca tamponul de inițiere a eluției să aibă o tărie ionică de 0,1.

În figura 3.7. prezentăm instalații simple, uşor de montat în laboratoare cu o dotare medie, pentru a realiza eluția unei coloane cromatografice, cu un gradient linear (a), concav (b) sau convex (c).

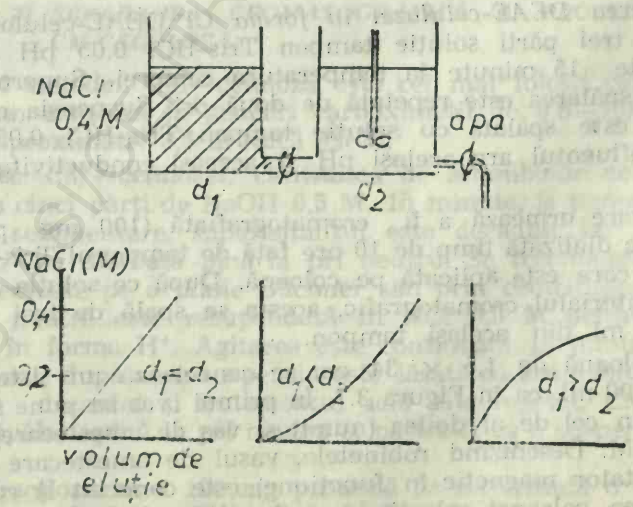


Figura 3.7. — Eluția unei coloane cromatografice cu un gradient crescător al concentrației de NaCl.

Experiența 26. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A PROTEINELOR PE DEAE-CELULOZĂ

Principiul metodei. DEAE-celuloza este un anionit slab utilizat foarte mult pentru separarea proteinelor, are un pK' de aproximativ 9,5 în NaCl 0,4 M—1,0 M. Conținutul în grupări bazice este de circa 1 mechiv/g DEAE celuloză.

Prepararea DEAE-celulozei în forma HO^-. Cantitatea necesară de DEAE-celuloză este amestecată cu cinci părți de NaOH 0,1 N, timp de 15 minute la temperatura camerii. După sedimentarea materialului cromatografic, particulele coloidale din supernatant sînt îndepărtate prin sifonare. Sedimentul este spălat cu apă distilată pînă cînd pH apelor de spălare atinge valoarea 8—9. DEAE-celuloza spălată în apă este amestecată cu trei părți etanol 96%, lăsată să sedimenteze, iar supernatantul alcoolic este decantat. Spălarea cu NaOH 0,5 N este repetată, după care schimbătorul este spălat cu apă distilată pînă la neutralitate. Spălările cu apa pot fi realizate în tuburi de centrifugă, sedimentarea realizîndu-se mult mai rapid prin centrifugare.

Suspensia apoasă de DEAE-celuloză forma HO^- trebuie păstrată la 4°C pentru a evita contaminarea microbiană.

În scopuri preparative și micro-preparative se montează coloane de 1,5 × 35 cm, umplute cu DEAE-celuloză 0,7—0,8 mechiv./g ce permit fracționarea a circa 100 mg proteină cu o viteză de eluție de 15—20 ml/oră. Eluarea unei astfel de coloane poate fi realizată — în trepte sau în gradient, prin (i) creșterea molarității tamponului de eluție ; (ii) creșterea pH tamponului de eluție cu menținerea constantă a molarității și (iii) creșterea concomitentă a pH și molarității tamponului de eluție. De exemplu, proba de cormatografiat este aplicată într-o soluție tampon 0,05M, pH 7,8—8,2 iar eluția este realizată cu soluții 0,1 M, 0,5 M și în final 1,0 M.

*Prepararea DEAE-celulozei în forma Cl^-.*DEAE-celuloza este suspendată în trei părți soluție tampon Tris-HCl 0,05 pH 8, omogenizată timp de 15 minute la temperatura camerei. Supernatantul este decantat și spălarea este repetată de două ori. Suspensia este pusă pe coloană și este spălată cu soluție tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8 pînă cînd efluentul are același pH și aceeași conductivitate cu acest tampon.

Proba care urmează a fi cromatografiată (100 mg proteină în 3—5 ml) este dializată timp de 10 ore față de tamponul Tris-HCl 0,05 M pH 8, după care este aplicată pe coloană. După ce soluția proteică s-a sorbit în materialul cromatografic, acesta se spală de trei ori cu porțiuni de 1 ml din același tampon.

La o coloană de 1,5 × 34 cm se conectează un sistem de două vase a cîte 100 ml, ca în Figura 3.7. În primul vas se pune soluție tampon 0,5 M, în cel de al doilea (numit și vas de amestecare) — soluție tampon 0,1 M. Deschizînd robinetele, vasul de amestecare (în care se află un agitator magnetic în funcțiune) este conectat la coloană și se începe eluarea coloanei colectîndu-se fracții a cîte 1—2 ml, care sînt analizate din punctul de vedereal adsorbției în UV, la 280 nm.

Cromatografierea proteinelor serice. O cantitate convenabilă de DEAE—celuloză pulbere este spălată prin decantare de trei ori cu apă distilată se realizează totdeauna pînă la neutralizare. La ultima spălare, luții : NaOH 0,5 M — apă distilată — NaH_2PO_4 0,3 M — apă distilată — NaOH 0,5 M — apă distilată — Na_2HPO_4 0,005 M. Spălările cu apă distilată se realizează totdeauna pînă la neutralizare. La ultima spălare, DEAE — celuloza este aproape echilibrată în primul tampon.

Schimbătorul de ioni suspendat în primul tampon este turnat pe o coloană cromatografică 1 × 60 cm și este lăsat să sedimenteze (cel mai bine, sub presiune de 500 g/cm² utilizînd aer comprimat). Dacă pH efluentului concordă cu pH lichidului de eluție — echilibrul a fost atins ; dacă nu, coloana se spală pînă la echilibrare. Primul vas (v. Figura 3.7) este umplut cu 1000 ml tampon fosfat 0,3 M pH 4,2 — vasul de amestecare este umplut cu 500 ml tampon fosfat 0,01 M pH 8,4 — între cele două vase existînd o diferență de nivel de 7,5 cm. TTamponul de start este un tampon fosfat 0,005 M, pH 8,4.

Se aplică pe coloană 2 ml ser proaspăt, dializat peste noapte față de tamponul de start. După ce serul s-a sorbit pe coloană, aceasta este spălată de trei cîte 2 ml tampon. Cromatografierea este începută cu tamponul de start, cu o viteză de 50 ml/oră, pînă cînd a fost eluat primul pic proteic. Urmează conectarea coloanei la sistemul gradient și continuarea eluției, colectîndu-se fracții a cîte 5 ml. Toate fracțiile (aproximativ 100) sînt analizate din punctul de vedere al concentrației proteice. Primul pic obținut cu tamponul de start conține o cantitate mare de γ-G-globulină. Celelalte picuri sînt ale β- și α-globulinelor, ultimul fiind cel al albuminei.

F a h e y recomandă un alt gradient de eluție: în primul vas — tampon fosfat 0,3 M pH 8,0 ; în vasul de amestecare — tampon fosfat 0,1 M pH 8,0.

Experiența 27. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A PROTEINELOR PE CM-CELULOZĂ

Principiul metodei. CM—celuloza este cel mai folosit cationit celulozic, avînd un conținut în grupări carboximetil de 0,6—1,0 mechiv./g și un pK' de aproximativ 3,5 în NaCl 0,5 M.

Prepararea CM—celulozei. Cantitatea de schimbător necesară este amestecată cu cinci părți de NaOH 0,5 M, 15 minute, la temperatura camerei. După sedimentare, supernatantul este decantat iar sedimentul este spălat cu apă distilată pînă la pH neutru. Se recomandă ca spălările să fie efectuate pe o pîlnie Büchner sau prin centrifugare.

Celuloza neutră este resupendată în HCl 0,5 M pentru a aduce schimbătorul în forma H^+. Agitarea este continuată 15 minute la temperatura camerii, după care suspensia este lăsată să sedimenteze, supernatantul este decantat și tratamentul acid este repetat. CM—celuloza este în final spălată pînă la pH neutru și păstrată, ca o suspensie apoasă, la 4°C.

Pentru fracționarea a 100 mg proteină se recomandă o coloană de 1,5 × 35 cm, umplută cu CM—celuloză de 0,7—0,8 mechiv./g. Eluția coloanei poate fi realizată în trepte sau în gradient. Eluția în gradient poate fi condusă prin : (i) creșterea molarității soluției tamponului de

eluție la pH constant ; (ii) modificarea pH de eluție la molaritate constantă și (iii) combinarea lui (i) cu (ii).

Cromatografierea pe o coloană de CM—celuloză forma H^+. Pe o coloană de 1,5×35 cm umplută cu CM—celuloză forma H^+ se aplică 100 mg proteină dizolvată în 5 ml acetat de amoniu 0,01 M pH 4,6. După ce proba este sorbită în stratul cromatografic, acesta este spălat de trei ori cu cîte 1 ml tampon. Coloana este spălată cu (1/2 din volumul ei) tampon acetat de amoniu 0,01 M pH 4,6, apoi este aplicat un gradient crescător de concentrație. În primul vas se pun 100 ml tampon acetat de amoniu 0,5 M pH 6,7, iar în vasul de amestecare — 100 ml tampon acetat de amoniu 0,01 M pH 6,7. Viteza de eluare a coloanei este de 1 ml/minut. Fracțiile colectate (1 ml) sînt analizate din punctul de vedere al concentrației proteice. Marele avantaj al acestui sistem tampon este că poate acoperi un larg domeniu al valorilor de pH și că este volatil.

Experiența 28. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A PROTEINELOR PE FOSFO-CELULOZĂ

Principiul metodei. P—celuloza este un cationit cu un înalt conținut în grupări fosfat (7,4 mechiv/g) ce poate fi folosit la valori de pH mici, unde ea își păstrează o mare afinitate pentru policationi.

Prepararea coloanei. Cantitatea de schimbător necesară este spălată de trei ori cu apă distilată prin decantare. Apoi P-celuloza este spălată cu următoarele soluții în ordinea : NaOH 0,5 M — apă distilată — H_3PO_4 0,1 M — apă distilată — tampon de start. Spălările cu apă distilată sînt făcute pînă cînd supernatantul atinge valoarea pH apei distilate. Echilibrarea finală cu tamponul de start se poate face direct pe coloană.

Separarea cromatografică. Pe o coloană de 1 × 50 cm umplută cu P-celuloză, preechilibrată în tampon NaH_2PO_4 Na_2HPO_4, 0,02 M pH 5,8 (tampon de start) se aplică 2 ml ser, dializat peste noapte față de același tampon. După ce serul a fost sorbit în stratul cromatografic, acesta este spălat de trei ori cu cîte 2 ml soluție tampon. Proteinele sînt eluate treptat, aplicînd pe coloană următoarele soluții tampon, în volume egale cu volumul coloanei :

soluție tampon fosfat 0,02 M pH 5,8
soluție tampon fosfat 0,04 M pH 5,8
soluție tampon fosfat 0,05 M pH 6,2
soluție tampon fosfat 0,06 M pH 6,6
soluție tampon fosfat 0,10 M pH 7,2
soluție tampon fosfat 0,10 M și NaCl 0,05 M pH 9,5

Eluția este realizată cu o viteză de 50 ml/oră, colectîndu-se fracții de cîte 5 ml. În fiecare fracție este determinată $D.O._{280}$. Fiecare soluție nouă este aplicată pe coloană numai după ce picul etapei anterioare a fost complet eluat.

Experiența 29. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A PROTEINELOR PE DEAE-SEPHADEX

Principiul metodei. DEAE-Sephadex este un schimbător de anioni slab bazic, cu gruparea funcțională dietilaminoetil și cu ionul de schimb Cl^-. Se recomandă utilizarea lui în domeniul de pH 2—9.

Prepararea coloanei. 1 g de schimbător este suspendat în apă distilată și lăsat să stea o oră, particulele fine nesedimentabile fiind îndepărtate prin decantare. Apoi schimbătorul de ioni este spălat cu NaOH 0,5 N — excesul de bază fiind îndepărtat prin spălări repetate cu apă distilată; spălarea DEAE-Sephadexului continuînd cu un acid. Deoarece proteinele serice sînt cromatografiate în tampon fosfat, spălarea trebuie realizată cu acid fosforic 0,1 M. Excesul de acid este îndepărtat prin spălare cu apă distilată, apoi materialul cromatografic este spălat cu tamponul de start pînă la atingerea echilibrului. Se recomandă ca toate aceste spălări să fie realizate pe o pîlnie Büchner.

Impachetarea coloanei. DEAE-Sephadex umflat, suspendat într-un exces de tampon este turnat pe o coloană cromatografică, umplută 1/3 din volumul ei cu tamponul de start și cu robinetul de evacuare închis. Suspensia de DEAE-Sephadex este omogenizată și robinetul de evacuare este ușor deschis. Coloana este reumplută cu DEAE-Sephadex pînă cînd gelul sedimentat atinge înălțimea dorită. Dacă stratul cromatografic nu este încă echilibrat în tamponul de start, urmează spălarea coloanei cu această soluție tampon pînă la echilibrare.

Prepararea gradientului de eluție. În vasul de amestecare se introduc 500 ml tampon de strat — Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 0,02 M pH 8,0, iar în primul vas — 1 000 ml tampon fosfat 0,3 M pH 8,0.

Aplicarea probei. 3 ml ser dializat peste noapte față de tamponul de start sînt aplicați pe o coloană de DEAE-Sephadex 2 × 50 cm. Proba este sorbită în gel, iar stratul cromatografic este spălat de trei ori cu cîte 2 ml tampon de start.

Cromatografia este realizată în același mod ca în cazul DEAE-celulozei.

La sfîrșitul separării cromatografice, gelul este scos de pe coloană, spălat cu Na_2HPO_4 1 M și apoi cu apă distilată, pînă cînd supernatantul are pH apei distilate. Apoi gelul este din nou echilibrat în tamponul de start.

Observații. Capacitatea DEAE-Sephadexului este de circa 3 mechiv/g — deci 3 ml ser pot fi fracționați de 1 g schimbător.

Deoarece schimbătorii pe bază de Sephadex se umflă considerabil prin scăderea tăriei ionice a soluției tampon, nu se recomandă utilizarea unor tampoane cu tării ionice mai mici de 0,05—1.

Se recomandă, după fiecare separare cromatografică, scoaterea gelului de pe coloană, spălarea și reîmpachetarea coloanei — operații care asigură omogenitatea stratului cromatografic.

Experiența 30. PREPARAREA γ-GLOBULINEI CU DEAE-SEPHADEX UTILIZÎND TEHNICA „BATCH"

Principiul metodei. În anumite condiții, DEAE-Sephadexul leagă toate proteinele serice, cu excepția γ-G-globulinelor.

Serul este amestecat cu DEAE-Sephadex echilibrat într-un tampon convenabil și lăsat peste noapte la 4°C. Suspensia este centrifugată, iar supernatantul este din nou supus unui tratament cu schimbător solid. După o nouă echilibrare peste noapte, prin centrifugare se obține în supernatant un preparat de γ-G-globulină — detectabil prin metode imunochimice.

Modul de lucru. DEAE-Sephadex este echilibrat în tampon fosfat 0,01 M pH 6,5. După echilibrare, tamponul este îndepărtat prin trecerea suspensiei pe o hîlnie Büchner cînd se obține gelul umed.

Se amestecă 1—30 ml ser cu gelul umed, suspensia fiind lăsată o oră la 4°C pentru echilibrare. Apoi amestecul este transferat pe o pîlnie Büchner și spălat cu tampon fosfat 0,01 M pH 6,5 rece pînă nu se mai detectează proteine în apele de spălare. Tamponul colectat ce conține proteinele nesorbite sînt tratate cu o nouă cantitate de schimbător umed. După o omogenizare energică, preparatul este lăsat la 4°C timp de o oră, după care proteinele nesorbite pe materialul cromatografic sînt spălate pe o pîlnie Büchner. Soluția de spălare, care conține γ-G-globulina pură, este concentrată prin liofilizare sau prin dializa la presiune.

3.11. ELECTROFOREZA

Cînd o particulă cu o sarcină electrică efectivă Q este forțată să migreze într-un mediu vîscos (lichid sau gel) sub acțiunea unui cîmp electric (gradent de potențal) *E*, procesul este denumit *electroforeză.* Forța motrice care acționează asupra particulei în mișcare cu o viteză constantă, este egală cu rezistența fricționată *f* pe care particula o întîmpină în deplasarea ei prin mediul electroforetic:

$$QE = f$$

În soluție, rezistența fricțională respectă legea lui Stoke:

$$f = 6\pi r \cdot v \cdot \eta$$

unde *r* este raza particulei, *v* — viteza de migrare a acesteia iar η este vîscozitatea mediului.

În geluri, rezistența fricțională este o funcție mai complexă, depinzînd de densitatea gelului, mărimea și forma particulei etc.

Mobilitatea electroforetică *m* a particulei este dată de relația:

$$m = \frac{d}{tE} = \frac{v}{E} \frac{Q \cdot v}{f} \text{ cm}^2/\text{volt} \cdot \text{secundă}$$

unde *d* reprezintă distanța de migrare a particulei în timpul *t*. Mobilitatea particulei este o constantă fizică în condiții electroforetice defi-

nite. *Mobilitatea absolută* este obținută prin împărțirea distanței de migrare, măsurate după terminarea electroforezei cu timpul destinat experimentului și gradientul de potențial aplicat. Cu condiția ca diferite experimente să fie realizate în condiții identice (E, t) se pot compara direct distanțele de migrare. *Mobilitatea relativă* este mobilitatea unei anumite proteine în raport cu un standard.

Mobilitatea electroforetică depinde de un număr de parametri : mărimea, forma, concentrația, sarcina electrică, gradul de hidratare și disociere ale particulei care migrează ; vîscozitatea, pH, temperatura și tăria ionică a mediului ; tăria cîmpului electric aplicat și timpul de migrare. Relațiile dintre mobilitatea electroforetică, viteza de migrare, tăria cîmpului, pH și tăria ionică a mediului sînt valabile atît pentru electroforeza cu curgere liberă cît și pentru cea pe un suport. În plus, la electroforeza pe suporturi devin manifești o serie de factori adiționali care influențează mobilitatea și acuratețea separării : adsorbția, neomogenitatea și capacitatea de schimb a suportului electroforetic, electroosmoza, efecte de sucțiune, încălzire, evaporare etc.

Curentul electric aplicat este limitat de *căldura ohmică* (J o u l e) generată în gel. Mobilitatea ionică și difuzia liberă crește cu ridicarea temperaturii, în timp ce vîscozitatea mediului scade. Prin creșterea cu un grad a temperaturii, mobilitatea crește cu aproximativ 2,4%. Căldura H generată de curentul I per unitatea de timp este descrisă de relațiile :

$$H = \frac{R \cdot I^2}{A} = \frac{V \cdot I}{A} = \frac{V^2}{RA} \text{ (wați)}$$

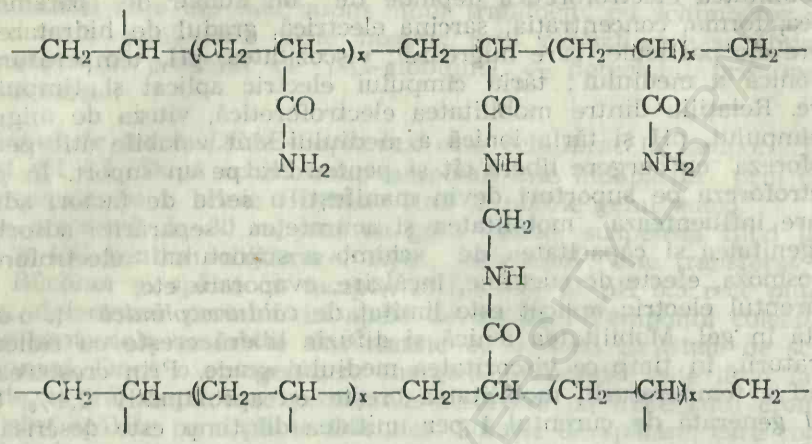
unde R este rezistența electrică a mediului, V — voltajul și A — echivalentul mecanic al căldurii ($4{,}185 \times 10^7$ erg/cal).

Disiparea căldurii ohmice este o problemă majoră a fiecărei metode electroforetice. Răcirea mediului electroforetic dă naștere unui *gradient de temperatură* între mediul interior și exterior straturilor, care este funcție de grosimea lor. În funcție de forma gradientului, zonele electroforetice sînt mai mult sau mai puțin distorsionate.

Pentru un aparat și pentru o tehnică dată migrarea unei substanțe trebuie să fie o funcție lineară în timp, în condițiile menținerii constante a gradientului de potențial și temperaturii. Dacă aceste condiții sînt respectate, viteza de electromigrare a substanței este direct proporțională cu voltajul aplicat la cele două capete ale suportului electroforetic. Pentru amfoliți — aminoacizi și proteine -pH soluției tampon exercită o puternică influență asupra mobilității substanțelor de separat. La valori de pH ale tamponului mai mici decît pH izoelectric al amfolitului, acesta va migra către polul negativ, în timp ce la valori de pH mai mari — migrantul se va deplasa spre polul pozitiv. Viteza de electromigrare este puternic influențată și de tăria ionică a mediului în care se face separarea electroforetică. Tării ionice slabe ale soluțiilor tampon permit obținerea unor viteze de migrare mari cu degajare mică de căldură, în timp ce tării ionice înalte conduc la viteze mici de migrare, degajări mari de căldură, zonele electroforetice fiind însă perfect conturate.

3.11.1. Electroforeza în gel de poliacrilamidă

Poliacrilamida este produsul polimerizării și înrețelării monomerului *acrilamida* $CH_2=CH-CO-NH_2$ cu comonomerul de înrețelare *N.N'—metilen—bis—acrilamida* (BIS) $CH_2=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$. Rețeaua tridimensională care rezultă are structura :



a cărui grad de înrețelare, densitate, viscozitate, tărie mecanică depinde de raportul monomer/comonomer. Dacă raportul acrilamidă/BIS este mai mic decît 10 — gelurile sînt fragile, rigide și opace. Geluri elastice și transparente sînt obținute la un raport 30, în care, concentrația în acrilamidă este mai mare decît 3%. La concentrații de 2% acrilamidă și 0,5% BIS nu se înregistrează nici o gelificare.

Polimerizarea este realizată în prezența unor sisteme catalizator — redox care furnizează radicali liberi — inițiatori ai procesului de polimerizare. Astfel de sisteme sînt :

Persulfatul de amoniu — N,N,N',N' —tetrametilendiamina (TEMED)

Riboflavină — TEMED (sistem fotocatalitic)

în care TEMED accelerează polimerizarea și catalizează eliberarea de radicali liberi ai oxigenului. Procedeul cu persulfat de amoniu are o serie de avantaje conferite de această substanță, chimică, care poate fi preparată într-o stare de înaltă puritate, este relativ stabilă la 0°C și are o mică tendință de-a dezvolta oxigen molecular. Sistemele catalitice nu trebuie să modifice condițiile tamponului selectat, conductivitatea electrică și viscozitatea gelurilor. Polimerizarea poate fi prevenită sau întîrziată de scăderea pH, prezența oxigenului molecular și a impurităților (în special metalele). La pH 8,8 — concentrație în acrilamidă de 7,5% polimerizarea prezintă o perioadă de lag de cîteva minute, apoi se înregistrează o creștere bruscă a vitezei acestui proces, care devine staționar după 30 minute. La pH 4,3 — viteza de polimerizare este mult mai lentă, fiind necesare aproximativ 90 minute pentru definitivarea acestui proces.

În contrast cu polimerizarea chimică cu persulfat — polimerizarea fotochimică cu riboflavină necesită urme de oxigen — excesul oxigenului fiind inhibitor. În anumite scopuri experimentale, în amestecul de polimerizare se introduc substanțe ca : glicerol, etilen glicol, uree, zaharoză — fără o inhibare a procesului. Ureea poate fi incorporată în gelul de poliacrilamidă pînă la o concentrație de 8 M.

Experiența 31. DISC ELECTROFOREZA

Principiul metodei

Proteinele sînt fracționate electroforetic pe mici coloane cilindrice de poliacrilamidă. Numele de „disc" electroforeză derivă atît de la forma de discuri pe care o au fracțiile proteice separate cît și de la sistemele *discontinui* de tampoane aplicate în această metodă.

Aparatură

1. Tuburi de sticlă, cu un diametru de 5—7 mm și o lungime de 100 mm, deschise la ambele capete. Cînd se introduse amestecul de polimerizare, unul din capetele tubului de sticlă este astupat cu un dop de cauciuc sau de material plastic.

2. Aparatul de electroforeză constă din două tancuri paralepipedice din plexiglas, fixate unul peste altul, în mijlocul lor fiind plasată camera electrozilor, în formă cilindrică și prevăzută cu niște orificii de contact cu soluția tampon. La baza tancului superior sînt practicate 12 orificii cu un diametru de 100 mm echidistante în suport cu electrodul (Figura 3.8).

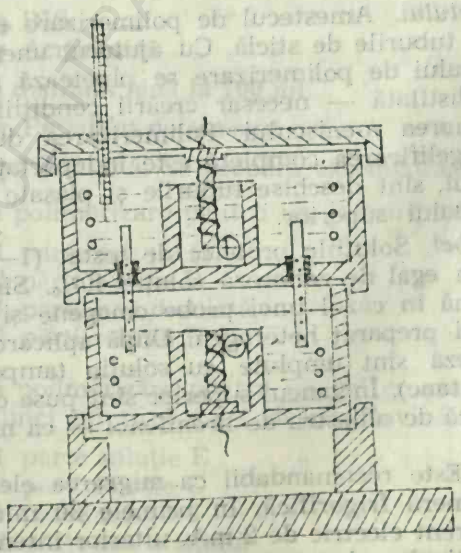


Figura 3.8. — Schema unui aparat de disc electroforeză.

Soluții

1.Soluții stoc pentru prepararea gelului

A : 48 ml HCl 1 N
36,6 g Tris—(hidroximetil)—aminometan
0,23 ml TEMED

dizolvate în apă distilată, pînă la un volum final de 100 ml.

B : 0,735 g BIS
28 g Acrilamidă

dizolvate în apă distilată, pînă la un volum final de 100 ml.

C : 0,14 g Persulfat te amoniu

dizolvat în 100 ml apă distilată/Soluția trebuie preparată extemporaneum.

2. Amestecul de polimerizare pentru un gel cu pori mici (pH 8,9)

1 parte soluție A
2 părți soluție B
1 parte soluție apă distilată
4 părți soluție C

3. Soluție tampon electrod (pH 8,3)

1,2 g Tris
5,76 g glicină

se aduce la 2 000 ml cu apă distilată.

4. Soluție de colorare Amido black 1%, preparată în acid acetic 7%.

Prepararea gelului. Amestecul de polimerizare este deaerat la vacuum și plasat în tuburile de sticlă. Cu ajutorul unei pipete Pasteur la suprafața amestecului de polimerizare se pipetează un strat de 1 mm înălțime de apă distilată — necesar creării condițiilor de anaerobioza și prevenind formarea meniscului. Polimerizarea durează aproximativ 30 minute. După gelificarea completă este îndepărtat stratul de apă de la suprafața gelului, sînt deschise tuburile și plasate în orificile practicate la baza tancului superior.

Aplicarea probei. Soluțiile proteice de testat (1—2 mg/ml) sînt diluate cu un volum egal de zaharoză soluție 40%. Sînt plasate per tub 40—100 μg proteină în cazul unei probe omogene și 200—250 μg proteină în cazul unui preparat heterogen. După aplicarea probelor, tancurile de electroforeză sînt umplute cu soluția tampon 3 (aproximativ 1000 ml în fiecare tanc). În tancul superior sînt puse cîteva picături dintr-o soluție alcoolică de albastru de bromfenol — ca marcher al migrării electroforetice.

Electroforeza. Este recomandabil ca migrarea electroforetică să fie realizată într-o cameră frigorifică. În primele 30 minute, electroforeza este realizată la curent electric de 2 mA, ulterior intensitatea crescînd la 5 mA. În cazul particular al separării electroforetice a proteinelor serice, migrarea decurge 60—90 minute.

Indepărtarea gelului din tubul de sticlă. La sfîrșitul electroforezei, tuburile sînt scoase din aparat și cu aujtorul unui ac de siringă se detașează gelul de pe suprafața tubului. Operația se face sub apă, care penetrează între gel și sticlă favorizînd detașarea.

Colorarea. Gelurile sînt plasate în eprubete și acoperite cu o soluție Amido black timp de o oră. După colorare, gelurile sînt spălate cu apă de robinet și apoi cu o soluție de acid acetic 7%. După ce tot excesul de colorant a difuzat din gel, benzile proteice separate electroforetic apar ca niște discuri albastre.

★

Electroforeza proteinelor bazice. Proteinele bazice sînt separate electroforetic la pH 4,3. Soluțiile necesare sînt :

1. Soluții stoc pentru prepararea gelului :

D : 48 ml KOH 1 N
17,2 ml acid acetic
4 ml TEMED

la care se adaugă apă distilată pînă la 100 ml

E : 48 ml KOH 1 N
2,87 ml acid acetic
0,46 ml TEMED

la care se adaugă apă distilată pînă la 100 ml

F : 0,40 g BIS
60 g Acrilamidă

la care se adaugă apă distilată pînă la 100 ml. Soluția se filtrează.

G : 2,5 g BIS
10 g Acrilamidă

la care se adaugă apă distilată pînă la 100 ml.

H : 0,28 g Persulfat de amoniu

dizolvat în 100 ml apă distilată. Se prepară extemporaneum.

2. Amestecul de polimerizare pentru un gel cu pori mici, la pH 4,3 :

1 parte soluție D
2 părți soluție F
1 parte apă distilată
4 părți soluție H

3. Amestecul de polimerizare pentru un gel cu pori mari la pH 6,8 necesită prepararea unei soluții 4 mg% de riboflavină (I) și constă din :

1 parte soluție E
2 părți soluție G
1 parte soluție I
4 părți apă distilată

polimerizarea avînd loc la lumină.

4. Soluție tampon electrod (pH 4,5)

62,4 g β-alanină
16 ml acid acetic

se aduce la 2 000 ml cu apă distilată.

Celelalte soluții, precum și modul de realizare al electroforezei sînt similare cu cele descrise anterior.

★

Electroforeza în prezența ureei. În prezența ureei, soluțiile amestecului de polimerizare sînt următoarele :

J : soluție uree 8 M (24 g uree recristalizată se dizolvă în 5 ml apă deionizată, iar pH este ajustat la 3,2 cu acid formic)

K : soluție Cyanogum 30%
L : 0,12 ml TEMED
25 ml soluție J
M : soluție saturată de persulfat de potasiu

Prepararea gelului. Se amestecă 7 ml soluție K + 3,5 ml soluție L + 17 ml soluție J într-un vas adaptat la o pompă de vid, în vederea dezaerării amestecului. Apoi se adaugă 0,7 ml soluție M și amestecul de polimerizare rezultat este turnat în tuburile de sticlă. Suprafața este acoperită cu un strat de 5—8 mm de apă distilată.

Soluție tampon electrod constă din uree 5,5 M — pH este ajustat la valoarea 3,2 cu acid formic.

Modul de realizare al electroforezei este similar cu cel descris anterior.

3.11.2. Electroforeza în gel de agar

Agarul este un amestec de polizaharide lineare compuse în principal din *D*-galactoză și 3,6-anhidro-L-galactoză, obținut din diferite specii de alge marine. Macromoleculele gelului de agar sînt ținute asamblat prin legături de hidrogen — spațiile libere din structura gelului formînd microcristalite. Agarul prezintă dezavantajul de a conține un număr mare de grupări încărcate electric, ceea ce conduce la apariția unor efecte secundare migrării electroforetice. A r a k i a demonstrat că agarul constă din două componente : *agaropectina*, fracția care conține grupările încărcate electric și *agaroza* — componenta practic neîncărcată electric. Pentru acest motiv, în ultimul timp se preferă separarea proteinelor prin electroforeză pe gel de agaroză.

Prin încălzirea unei anumite cantități de agar sau agaroză, suspendate într-o soluție tampon adecvată, pe o sită de azbest, sub agitare continuă, are loc îmbibarea particulelor polizaharidului și formarea unei soluții care prin răcire gelifică.

Experiența 32. SEPARAREA PROTEINELOR PE GEL DE AGAR

Principiul metodei. În cîmp electric, printr-un gel de agar preparat într-o soluție tampon, componentele unui amestec de proteine migrează

în direcția și la viteza corespunzătoare încărcării lor electrice. Fracțiile separate pot fi detectate prin tehnici speciale de colorare și determinate cantitativ.

Aparatura

1. Aparat de electroforeză orizontală ;
2. Redresor de curent 0—600 V și 0—60 mA ;
3. Plăci de sticlă de dimensiunea 3×21 cm.

Soluții.

1. Soluția ampon (29,43 g veronal sodic și 19,43 g CH_3—COONA·$3H_2O$ sînt dizolvate în aproximativ 1 000 ml apă distilată. La această soluție se adaugă 180 ml HCl 0,1 N și volumul este adus la 3 000 ml cu apă distilată : pH soluției este 8,6) ;

2. Soluția de agar (1,5 agar solid este amestecat cu 100 ml soluție tampon 1 diluată 1:1 cu apă distilată. Suspensia este încălzită, sub agitare continuă, pe o plită de azbest pîn ăse obține o soluție limpede).

Prepararea plăcilor cu agar. Pe fiecare placă, bine spălată, degresată și uscată, se pipetează 12 ml gel fierbinte — operația se realizează pe o suprafață perfect orizontală, suficient de repede pentru ca gelul să nu se solidifice. După ce gelul s-a solidifcat, se practică în mijlocul plăcii, în masa gelului, o fantă care marchează linia de start și în care se aplică amestecul de proteine care urmează a fi separat electroforetic.

Umplerea tancului electroforetic cu tampon. În fiecare compartiment al tancului electroforetic se introduc circa 500 ml soluție tampon 1 și se stabilește contactul între ele. Se introduc plăcile cu agar, iar legătura cu soluția tampon este asigurată prin intermediul unor benzi de hîrtie de filtru umectate în tampon.

Aplicarea probei. Proba de analizat se încălzește la 37°C pe o baie de apă și se amestecă 1:1 cu o cantitate din gelul fluid 2. Amestecul se introduce repede, cu ajutorul unei pipete Pasteur, în fanta practicată în gel, la jumătatea plăcii. În cîteva minute, gelul se solidifică, înglobînd proba și refăcînd uniformitatea suportului electroforetic.

În cazul particular, în care se face separarea electroforetică a proteinelor serice, pe placa cu agar se aplică amestecul 0,2 ml ser + 0,3 ml apă distilată + 0,5 ml soluție agar 1,5%.

Electroforeza. Proteinele serice sînt supuse electroforezei la 6 V/cm timp de 4—5 ore — temperatura de lucru nu trebuie să depășească 30°C.

Fixarea proteinelor. Fracțiile proteice separate electroforetic sînt fixate pe placa cu gelul de agar prin plasarea acesteia într-o soluție de acid acetic 2% timp de o oră.

Uscarea plăcii cu agar. După operația de fixare a proteinelor, placa este acoperită cu o hîrtie de filtru îmbibată în apă distilată și uscată la 37°C peste noapte.

După uscare, hîrtia de filtru este îndepărtată și placa cu agar este colorată prin metoda dorită.

Observații. Deoarece procesul de electroforeză este puternic, migrarea proteinelor către catod este accelerată. Pentru a evita aecst proces se recomandă aplicarea probei de separat în mijlocul plăcii cu agar.

3.11.3. Electroforeza pe hîrtie

În cele ce urmează vom descrie separarea proteinelor prin electroforeză pe hîrtie — suportul cel mai mult studiat din punctul de vedere al mecanismelor care stau la baza electroforezei.

Experiența 33. SEPARAREA PROTEINELOR SERICE PRIN ELECTROFOREZA PE HÎRTIE

Principiul metodei. Într-un cîmp electric generat printr-o hîrtie de filtru specială, umectată într-o soluție tampon, proteinele serice migrează în direcția și cu viteza corespunzătoare sarcinii lor electrice.

Aparatura

1. Aparat de electroforeză orizontală ;
2. Redresor de curent 0—600 V și 0—60 mA ;
3. Hîrtie de filtru ; Schleichel-Schül 2043 *a* și *b*, Whatman 1 și 4, Munktell 20 și Macherey-Nagel 214.

Soluții tampon. Se recomandă aceeași soluție tampon ca cea descrisă în Experiența 32.

pH soluțiilor tampon foolsite în electroforeza pe hîrtie a proteinelor serice trebuie să fie cuprins între 8,0 și 9,0 — la aceste valori de pH toate fracțiile proteice din ser migrează către anod (punctele izoelectrice ale proteinelor serice se găsesc între pH 4,7 și pH 7,0). Tăria ionică a soluțiilor tampon trebuie să fie 0,06—0,1 μ. Sub 0,06 μ capacitatea de tamponare este insuficientă și fracțiile proteice nu se separă clar. În afara soluției tampon recomandate, electroforeza proteinelor serice mai poate fi condusă cu succes și în următoarele soluții tampon :

(i) tampon barbiturat sodic-acid barbituric : 10,3 g barbiturat sodic dizolvat în 1 000 ml apă distilată + 1,84 g acid barbituric dizolvat la 1 000 ml apă distilată, pH 8,6 $\mu = 0{,}06$.

(ii) tampon barbiturat sodic-acetat sodic : 7,36 g barbiturat sodic și 3,86 g $CH_3COONa \cdot 3\,H_2O$ dizolvate în 1 000 ml apă distilată ; pH 9,0, $\mu = 0{,}06$.

(iii) tampon borat : 8,8 g borat de sodiu și 4,05 g acid boric dizolvate în 1 000 ml apă distilată ; pH 8,6 ;

(iv) tampon Tris-EDTA : 60,5 g Tris + 6,0 g EDTA (acid) + 4,6 g acid boric în 1 000 ml volum final ; pH 8,9. Molaritățile speciilor respective sînt 0,5—0,021 și respectiv 0,075. Cu acest tampon s-a reușit fracționarea a 9 proteine serice : prealbumina, albumina, 3 componente α, 3 componente β și γ-globulina.

Soluțiile tampon trebuiesc ținute în frigider pentru a evita contaminarea bacteriană. Aceste soluții trebuiesc ținute maximum 10 zile. Polii aparatului trebuiesc schimbați după fiecare migrare electroforetică. Soluția tampon nu trebuie folosită mai mult de 3—4 ori.

Umectarea benzilor de hîrtie cu soluția tampon. Se taie benzile de hîrtie, conform unor dimensiuni stricte și se marchează linia de start cu ajutorul unui creion.

Benzile de hîrtie marcate sînt imersate de mai multe ori în soluția tampon, ținute în poziție verticală pentru a se scurge picăturile tamponului și tamponate cu hîrtie de filtru uscată. Se introduc în tanc și se întind cu autorul cadrului metalic.

Aplicarea serului. Se aplică 0,01 ml ser în linia de start.

Electroforeza. Separarea electroforetică a proteinelor serice pe hîrtie se face la 110 V timp de 12—16 ore, aplicînd cca. 1 mA/bandă. Creșterea voltajului, pentru a reduce timpul de migrare, are ca efect direct dezvoltarea de căldură — efect ce poate fi contracarat prin scăderea tăriei ionice a soluției tampon.

În continuare vom discuta o serie de factori care afectează migrarea electroforetică.

(i) *Electroosmoza.* Dacă un curent electric trece prin hîrtia de filtru umectată în soluția tampon, apare fenomenul de electroosmoză : componentele tamponului migrează către catod — în direcție opusă migrării proteinelor.

(ii) *Curgerea soluției tampon.* În primele 30—60 minute de migrare electroforetică, se înregistrează un fenomen de curgere a tamponului pînă cînd este atins un echilibru între conținutul tamponului din cele două compartimente și din banda de hîrtie. Acest fenomen este complet eliminat dacă se realizează o migrare liberă timp de 30 minute, după care se aplică proba.

(iii) *Căldura Joule.* În timpul electroforezei este generată căldură care mărește evaporarea la suprafața benzii de hîrtie. Datorită acestei evaporări, tamponul devine mai concentrat, crește conductivitatea și o cantitate mai mare de căldură se degajă. Lichidul evaporat este înlocuit cu tamponul din compartimentele tancului prin procese de capilaritate, conducînd la o curgere a tamponului de la marginile hîrtiei spre mijlocul ei. Pe o parte, direcția de curgere a tamponului coincide cu migrarea proteinelor favorizînd-o în timp ce pe partea opusă o împiedică. Tot ca un rezultat al evaporării, vaporii de apă condensează pe capacul tancului de unde cad picături pe benzi. Toate aceste efecte nedorite pot fi evitate prin realizarea unei umidități în tancul electroforetic și prin plasarea unei hîrtii de filtru, care capitonează capacul tancului.

(iv) *Adsorbția proteinelor pe banda de hîrtie.* Acest fenomen nedorit este mai pronunțat la pH acide și tării ionice scăzute. Adsorbția este datorată interacțiilor dintre sarcinile negative ale hîrtiei și sarcinile pozitive ale proteinei. Dintre proteinele serice, lipoproteidele sînt cel mai puternic adsorbite. Fenomenul de adsorbție conduce la formarea unor zone cu trenă și la separări defectuoase.

Îndepărtarea și uscarea benzilor de hîrtie. La sfîrșitul migrării electroforetice, benzile de hîrtie sînt scoase din tancul electroforetic și plasate într-o etuvă la 110°C pînă se usucă. Temperatura ridicată denaturează și fixează proteinele.

3.11.4. Electroforeza pe benzi de Cellogel

Cellogelul se obține prin gelatinizarea membranelor de acetat de celuloză, fiind accesibile comercial folii (2,5×17 cm) suspendate în metanol 30%.

Experiența 34. SEPARAREA PROTEINELOR PRIN ELECTROFOREZĂ PE BENZI DE CELLOGEL

Principiul metodei. Proteinele serice sau dintr-un extract proteic total sînt aplicate sub forma unui sport linear la 2—3 cm de la capătul catodic pe o folie de cellogel umectată într-o soluție tampon și migrează sub acțiunea unui gradient de potențial conform sarcinii lor electrice.

Aparatura

1. Aparat de electroforeză orizontală;
2. Redresor de curent de 0—500 V și 0—60 A;
3. Folii de cellogel;
4. Aplicator linear.

Soluții tampon

1. Soluție tampon Tris-glicocol pH 8,3 (0,6 g Tris + 2,88 g glicină la 1 litru apă distilată) sau
2. Soluție tampon veronal sodic-veronal-Tris pH 9 (10,3 g veronal sodic + 1,84 g veronal + Tris la 1 litru apă distilată).

Prepararea suportului electroforetic

Înainte de utilizare, benzile de Cellogel sînt imersate 10 minute în soluția tampon avînd grije să nu se lipească. Benzile tamponate sînt plasate între două folii de hîrtie de filtru pentru îndepărtarea excesului de soluție tampon și trebuie plasate imediat în tancul electroforetic. Suprafața cu gel, în care migrează proteinele este netedă, putînd fi recunoscută prin observarea colțului retezat al benzii. Acest colț retezat trebuie plasat la dreapta jos, pentru a avea deasupra suprafața penetrabilă, pe care se află proba care urmează a fi supusă electroforezei. Benzile trebuie să fie bine întinse cu niște clame de plastic.

Modul de lucru

Se aplică ,5/µl ser pe o lungime de 16 mm la 2 cm de capătul catodic. După închiderea etanșă a tancului electroforetic, separarea este realizată timp de 75 minute la 200 V.

Colorarea proteinelor serice

După terminarea separării electroforetice, benzile se imersează 5 minute într-o soluție care conține, 0,5 g Ponceau S și 100 ml acid tricloracetice 5%. Decolorarea se realizează prin spălarea benzilor în trei băi cu acid acetic 5%.

Diafanizarea benzilor

În vederea densitometrării, benzile se dezhidratează prin plasarea lor 1 minut într-o baie cu metanol pur. Apoi sînt spălate timp de 1—2 minute într-o soluție proaspăt preparată formată din 86 ml metanol și 16 ml acid acetic. Se plasează benzile pe o placă de sticlă și după îndepărtarea bulelor de aer și a excesului de soluție se încălzesc la 60—70°C timp de 4—6 minute. Se lasă placa să se răcească și apoi benzile pot fi densitometrate.

Păstrarea benzilor se realizează într-o folie de plastic.

BIBLIOTECA DE BIOLOGIE

CAPITOLUL IV

METODE DE DETECTARE A PROTEINELOR ȘI ENZIMELOR SEPARATE ELECTROFORETIC

În această secțiune vom prezenta principalele metode de vizualizare a proteinelor și enzimelor, separate prin electroforeză pe geluri de poliacrilamidă, agar, amidon sau pe hîrtie.

4.1. REACȚII DE CULOARE PENTRU PROTEINE

În literatura de specialitate sînt prezentați un număr mare de coloranți proteici folosiți după separările electroforetice: *Amido Black, Procion Brilliant Blue RS, Coomassie Brilliant Blue R 250, Fast Green FCF* etc.

Experiența 35. COLORAREA PROTEINELOR CU AMIDO BLACK

Prepararea soluției de colorant. 10 g Amido black sînt dizolvate în 900 ml apă distilată și apoi sînt precipitate prin adiția de 100 ml HCl conc. Supernatantul este decantat și precipitatul este spălat cu 1 000 ml HCl 10%. După spălarea cu HCl, precipitatul este spălat cu apă distilată pînă cînd filtratul nu mai are tentă albastră. Precipitatul este apoi suspendat în apă distilată și pH suspensiei este ajustat la valoarea de 6,5 cu o soluție diluată de NaOH. Suspensia este apoi încălzită la fierbere, răcită și uscată la sec pe baie de apă. S-a obținut un compus purificat, care poate fi folosit la colorarea protenelor.

1g Amido black purificat este dizolvat într-un amestec de 90 ml metanol și 10 ml acid acetic glacial.

Modul de lucru. Cînd separarea electroforetică a proteinelor a fost efectuată pe benzi de hîrtie, acestea sînt fixate la cald, prin feirbere în metanol pe o baie de apă 2—3 minute, colorarea fiind realizată la 80°C timp de 4 minute. După colorare, benzile sînt întinse pe o placă de sticlă, ținute 5 minute la temperatura camerii și spălate cu o soluție de acid acetic 4% la 80°C.

Cînd separarea electroforetică a proteinelor a fost efectuată pe gel de agar, colorantul se prepară din 1 g Amido black dizolvat în 900 ml tampon acetat (500 ml acid acetic M + 500 ml acetat de sodiu 0,1 M) + + 100 ml glicerol. Timpul de colorare este de 5 ore, iar soluția de spă-

lare constă din 830 ml apă distilată + 20 ml acid acetic + 150 ml glicerol.

Cînd separarea electroforetică a proteinelor a fost efectuată pe gel de poliacrilamidă, colorantul se prepară din 1 g Amido black 10 B dizolvat în 200 ml amestec acid acetic : metanol : apă distilată (1:5:5). Timpul de colorare este de 30 minute, iar soluția de spălare este un amestec de acid acetic : metanol : apă distilată (1:5:5) sau acid acetic 7%.

Experiența 36. COLORAREA PROTEINELOR CU FUCSINĂ ACIDĂ

Reacțivi și soluții.

1. Soluția de colorare : 2 g fucsină acidă sînt dizolvate într-un amestec de 500 ml metanol + 400 ml apă distilată + 100 ml acid acetic glacial.

2. Soluția de diferențiere :500 ml metanol + 400 ml apă distilată + 100 ml acid acetic glacial.

3. Soluția de spălare : acid acetic 10%.

Modul de lucru. Benzile de hîrtie sînt fixate la cald și apoi sînt plasate în soluția de colorare 15 minute. După colorare, benzile sînt transferate în soluția de diferențiere, unde-s ținute tot 15 minute. Urmează spălarea benzilor cu soluția 3, pînă cînd hîrtia de filtru care nu conține proteine este complet albă.

Avantajul colorării cu fucsină acidă constă în aceea că agentul de colorare nelegat de proteină poate fi complet îndepărtat de pe hîrtie.

Experiența 37. COLORAREA PROTEINELOR CU ALBASTRU DE BROMFENOL

Reactivi și soluții.

1. Soluția de colorare : soluție 1% de albastru de bromfenol preparată în etanol saturat cu $HgCl_2$;

2. Soluțiile de diferențiere : (i) — metanol conținînd 1% $HgCl_2$ și (ii) — etanol conținînd 1% $HgCl_2$.

3. Soluția de spălare : metanol.

Modul de lucru. Benzile de hîrtie sînt fixate la cald și apoi sînt plasate în soluția de colorare 5 minute. Diferențierea se realizează 15 minute în soluția (i) și alte 14 minute în soluția (ii). În final, benzile se spală cu metanol.

Experiența 38. COLORAREA LIPOPROTEINELOR CU SUDAN BLACK

Reactivi și soluții.

1. Soluția de colorare stoc : 0,5 g Sudan black BB sînt dizolvate în 500 ml metanol (se recomandă a fi folosită la 6—8 zile de la preparare) ;

2. Soluția de colorare : 100 ml soluție 1 + 180 ml metanol + 120 ml apă distilată (soluția poate fi utilizată numai de 4—5 ori).

Modul de lucru. Benzile de hîrtie sînt fixate la cald și apoi sînt plasate în soluția de colorare 60 minute. Spălarea se face cu apă de robinet pînă cînd nu mai este eliberat colorant.

Ambele soluții (1 și 2) trebuie ținute la întuneric, în sticle perfect închise, iar colorantul trebuie totdeauna filtrat înaintea folosirii. Sudan black colorează în albastru benzile de lipoproteide.

Cînd separarea electroforetică a proteinelor a fost efectuată pe gel de agar — soluția de colorare conține : 1,2 g Sudan black dizolvat într-un amestec de 400 ml etanol absolut + 380 ml apă distilată + 20 ml NaOH 25%, este adusă la fierbere și răcită. Timpul destinat colorării lipoproteinelor este de 2 ore, iar spălarea se efectuează cu etanol 50%. Înaintea colorării lipoproteidelor, plăcile cu agar sînt fixate 6 ore într-o soluție de fixare care constă din 500 ml etanol + 20 ml $CaCl_2$ 10% + 20 ml acid acetic + 460 ml apă distilată.

Experiența 39. COLORAREA GLICOPROTEINELOR CU ALBASTRU DE TOLUIDINĂ

Reactivi și soluții.

1. Reactiv periodat (1,2 g acid periodic este dizolvat în 30 ml apă distilată, apoi se adaugă 15 ml acetat de sodiu 0,5 M și 100 ml etanol 96%) proaspăt preparat ;
2. Soluția de diferențiere : 100 ml metanol + 20 ml acid acetic glacial + 80 ml apă distilată ;
3. Apă de brom ;
4. Soluție apoasă 1% de albastru de toluidină ;
5. Soluție 4% de molibdat de amoniu ;
6. Acetonă.

Modul de lucru. Benzile de hîrtie sînt fixate la cald și apoi sînt plasate în soluția 1 — timp de 15 minute, apoi în soluția 3 — încă 15 minute. După ce au fost scoase din soluția apei de brom, benzile sînt spălate în jet de apă la robinet și plasate 30 minute în soluția de albastru de toluidină (4). Urmează o spălare a benzilor, 40 minute, în apă de robinet, apoi o fixare 3 minute în soluția 5, după care ele sînt trecute în soluția de dfierențiere 2 și ținute 15 minute. Fracțiile glicoproteice apar ca niște benzi albastre pe un fond roz-violet. Benzile de hîrtie sînt apoi imersate în acetonă și uscate în aer.

Experiența 40. COLORAREA GLICOPROTEINELOR CU ACID PERIODIC-REACTIV SCHIFF

Reactivi și soluții.

1. Reactiv periodat : 1,2 g acid periodic sînt dizolvate în 30 ml apă distilată. La această soluție se adaugă 15 ml acetat de sodiu 0,5 M și 100 ml etanol. Reactivul trebuie preparat extemporaneum înainte de folosire.
2. Reactiv iodură-tiosulfat : 5 g KI și 5 g $Na_2S_2O_3$ sînt dizolvate în 100 ml apă distilată. La această soluție se adaugă 150 ml etanol 96% și 2,5 ml HCl 2 N. Reactivul trebuie preparat extemporaneum.
3. Reactiv de colorare : 1,5 g fucsină bazică sînt dizolvate în 200 ml apă distilată, apoi se adaugă 1,5 g metabisulfit de potasiu și 3 ml HCl conc. Soluția este lăsată să stea 12 ore la refrigerator, apoi este ames-

tecată cu 3—4 g cărbune activ și filtrată prin mai multe filtre de hîrtie. Filtrarea trebuie repetată pînă cînd filtratul este incolor (tentă slab roz). Soluția poate fi păstrată 2—3 zile.

4. Reactiv de spălare : 0,4 g metabisulfit de potasiu, dizolvat în 100 ml apă distilată, la care se adaugă 1 ml HCl conc.

5. Reactiv de fixare : formol 40% — HCl conc. — 100 : 3.

Modul de lucru. Benzile de hîrtie fixate sînt plasate în reactiv 1—10 minute, apoi sînt spălate cu etanol 70%. Urmează imersarea benzilor în reactivul 2, timp de 8 minute și din nou spălare cu etanol 70%. Benzile sînt apoi colorate în soluția 3 timp de 30 minute, iar după colorare, ele sînt spălate cu soluția 4 de trei ori cîte 5 minute, apoi sînt plasate pentru 2 minute în HCl soluție 0,5. În final, benzile sînt puse în reactiv 5—20 minute, spălate într-o baie de acetonă timp de 2 minute și uscate în aer.

Experiența 41. EVIDENȚIEREA TRANSFERINELOR

Transferina (siderofilina)este o metaloproteină care transportă fierul în sînge. Are masa moleculară de 88 000 și migrează în zona β-globulinelor, legînd doi ioni de fier. Transportul fierului în organism se realizează printr-un proces de oxido-reduce $Fe^{3+} \rightleftarrows Fe^{2+}$ prin care Fe^{3+} din feritina conținută în mucoasa duodenală este redus la Fe^{2+}, formă sub care fierul trece în sînge și este vehiculat de transferină.

Reactivi și soluții.

1. $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

2. Reactivul de colorare cuprinde 1 g hidroxilamină. HCl + 2,7 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ + 1,5 ml acid acetic glacial + 0,3 g Nitrozo R salt dizolvate în apă distilată pînă la un volum final de 100 ml.

3. Soluția de spălare : 50 ml metanol + 50 ml apă + 10 ml acid acetic glacial.

Modul de lucru. Serul sanguin este tratat cu cu sulfat de fier amoniacal pînă cînd acesta conține 5 μg Fe^{3+}/ml.

Serul astfel tratat este supus electroforezei conform modului descris în Experiența 31.

După terminarea electroforezei, gelurile sînt imersate 10 minute în soluția de colorare, cînd tranferinele apar sub forma unor benzi verzui. După această perioadă de timp apar și alte benzi datorită colorării nespecifice și a altor tipuri de proteine.

După 10 minute, gelurile sînt plasate în soluția de spălare, care stopează procesul de colorare nespecific.

4.2. REACȚII DE CULOARE PENTRU ENZIME

Prin electroforeză pot fi separate și proteine cu activități enzimatice, vizualizarea benzilor obținute fiind realizată pe baza funcției lor catalitice. Această metodă a fost mult utilizată în depistarea formelor moleculare cu aceeași activitate catalitică, numite *izoenzime*. Conceptul de izoenzime a atras atenția cercetătorilor din domeniul științelor biologice ; sistematica animală și vegetală, genetica, agronomia, medicina

etc. — care au întrevăzut posibilitatea elucidării unor probleme, în lumina noilor date despre structura enzimelor. În acest fel a apărut un domeniu nou al taxonomiei biochimice, care se ocupă cu studiul clasificării sistematice a vieţuitoarelor ţinînd seama nu numai de caracteristicile morfologice ci şi de unele proprietăţi biochimice ale proteinelor constituente, schiţele izoenzimelor studiate fiind o adevărată bază de comparaţie. Cercetările de biochimie medicală au indicat posibilitatea utilizării studiului unor izoenzime ca teste valabile în depistarea timpurie a unor maladii (infarct miocardic, hepatite etc.). Studiile de ameliorare genetică au beneficiat şi ele de această concepţie, constatîndu-se diferenţe semnificative în comportamentul izoenzimelor diferitelor rase de animale şi soiuri de plante, supuse selecţiei.

Motivele multiplicităţii moleculare a proteinelor şi enzimelor sînt însă variate. Izoenzime pot fi considerate numai proteinele genetic independente (de exemplu, malat dehidrogenazele din mitocondrie şi citoplasmă), heteropolimerii hibrizi constituiţi din două sau mai multe catene polipeptidice legate necovalent (de exemplu lactat dehidrogenazele) şi variantele genetice (de exemplu glucozo-6-fosfat dehidrogenazele). Deci, termenul de izoenzimă trebuie utilizat numai pentru acele forme moleculare care rezultă din controlul genetic al structurii primare a proteinelor şi nu pentru acele forme derivate din modificarea secvenţei primare. Cu toate acestea, în cazul în care nu este cunoscută natura multiplicităţii enzimatice, se permite utilizarea termenului de izoenzime pentru definirea proteinelor cu aceeaşi activitate catalitică separabile electroforetic.

Experienţa 42. EVIDENŢIEREA IZOENZIMELOR LACTAT DEHIDROGENAZEI

Principiul metodei. Majoritatea ţesuturilor animale conţin pînă la 5 izoenzime ale lactat dehidrogenazei (LDH) — uşor de separat prin electroforeză. Ele sînt numerotate în funcţie de viteza lor de migrare spre anod, astfel că LDH_1 este specia cu cea mai rapidă migrare, iar LDH_5 are cea mai mică mobilitate. Izoenzimele LDH apar din diferitele combinaţii a două subunităţi pentru a forma cinci structuri, tetramere. LDH_1 conţine numai subunităţi H şi predomină în ţesutul miocardic (H — *heart*) în timp ce LDH_5 conţine numai subunităţi M şi predomină în muşchiul striat (*M* — muscle). Celelalte trei izoenzime (LDH_2, LDH_3, LDH_4) apar din combinarea acestor două subunităţi pentru a forma molecule hibride (Figura 4.1). Cantitatea şi distribuţia acestor izoenzime este o caracteristică a ţesutului de origine şi permite stabilirea stării acestuia.

LDH_2 este găsită în concentraţiile cele mai mari în serul sanguin normal. Raportul LDH_1/LDH_2 este deci subunitar. După infarctul miocardic, se înregistrează o puternică creştere a activităţii izoenzimei LDH_1 în serul sanguin şi deci raportul LDH_1/LDH_2 devine supraunitar. În general, activitatea LDH creşte de 2—3 ori în primele 12—24 ore după instalarea infarctului miocardic, atinge o valoare maximă la 3—4 zile şi rămîne crescută aproximativ două săptămîni. Maladiile care afectează ficatul şi muşchiul striat pot fi detectate prin demonstrarea unei activităţi LDH_5 crescute (Figura 4.2).

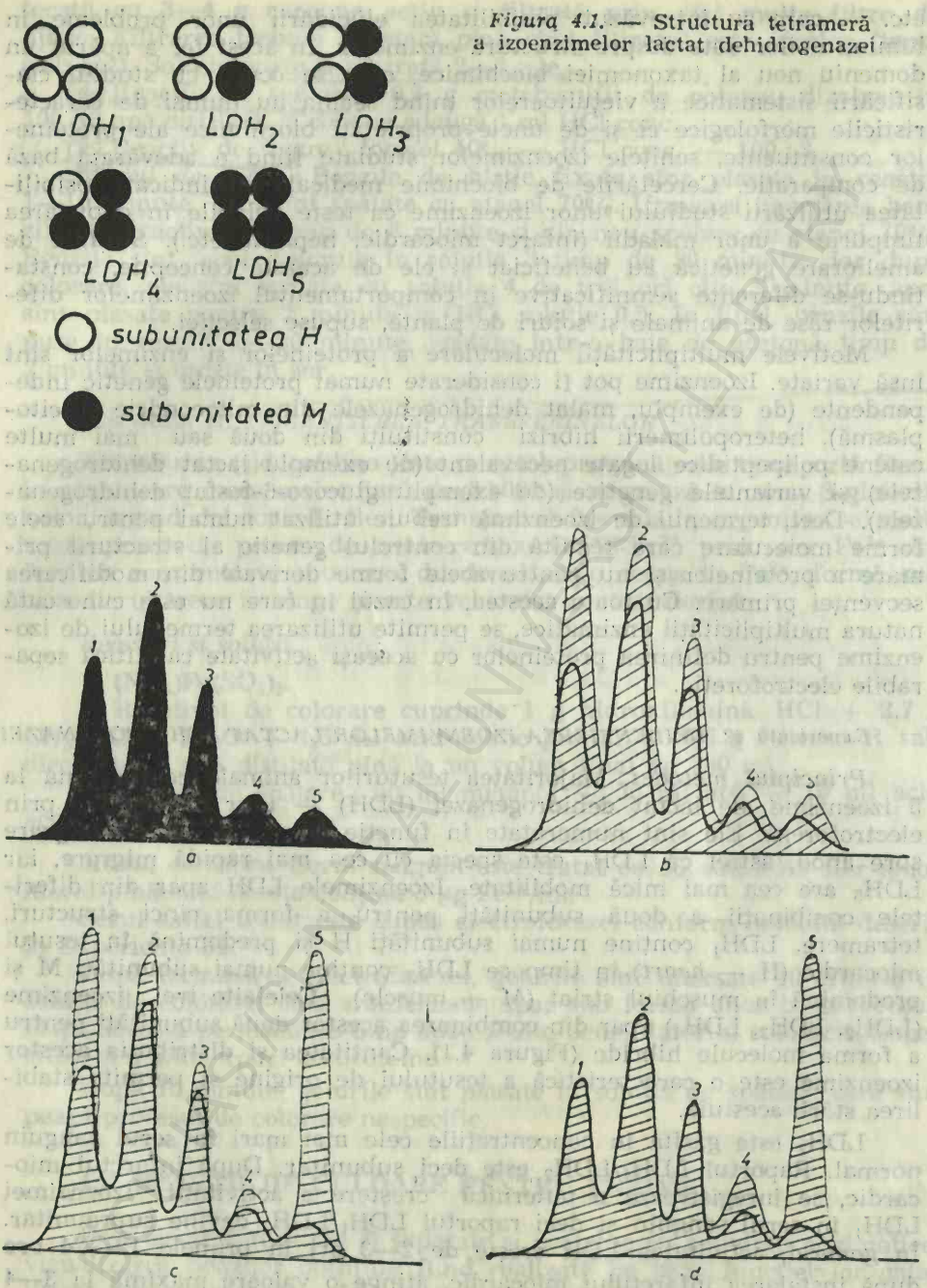


Figura 4.1. — Structura tetrameră a izoenzimelor lactat dehidrogenazei

Figura 4.2. — Rezultatele densitometrării zigogramelor LDH în caz normal (a), după infarct miocardic (b), după congestia ficatului (c), și dezintegrarea țesutului hepatic (d). Curbele haşurate reprezintă variațiile față de valorile normale.

Izonzimele LDH sînt vizualizate prin incubarea gelurilor cu un amestec conținînd substratul și coenzima, fenazin metosulfat (un acceptor artificial de electroni) și o sare de tetrazoliu. Prin reducerea sării de tetrazoliu se formează un formazan puternic colorat care precipită la situsurile cu activitate enzimatică (Figura 4.3).

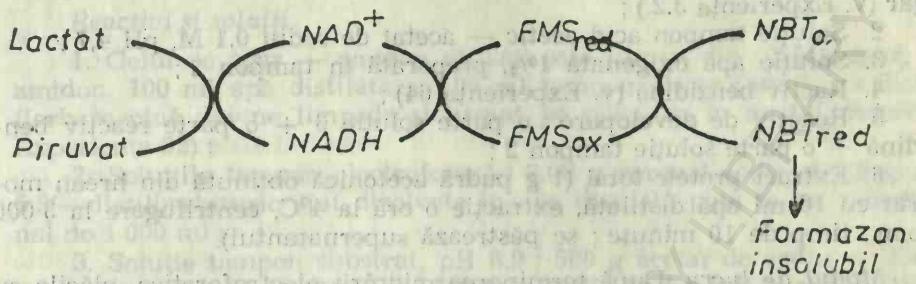


Figura 4.3. — Scurgerea electronilor în sistemul enzimatic catalizat de lactat dehidrogenază.

Reactivi și soluții.

1. Reactivii și soluțiile pentru o separare electroforetică în gel de poliacrilamidă (v. Experiența 2.11.1.1.).
2. Soluție tampon KH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,05 M, pH 7,4 ;
3. Soluție tampon Tris—HCl 0,1 M ,pH 9,2 ;
4. Lactat de litiu ;
5. NAD^+ ;
6. Nitro blue tetrazoliu (NBT) ;
7. Fenazin metosulfat (FMS) ;
8. Reactiv de developare (Lactat de litiu 0,1 M, 50 mg NAD^+ și 5 mg NBT în 100 ml soluție tampon 3. Soluția este stabilă o săptămînă la 4°C și la întuneric. Imediat înaintea folosirii se adaugă 0,5 mg FMS).
9. Omogenitate tisulare preparate din ficat, mușchi striat și inimă de la un șobolan sacrificat (1 g — 10 ml) în soluția tampon 2. După o oră de extracție la 4°C, omogenatele sînt centrifugate la 6 000 t.p.m. timp de 15 minute. Se păstrează supernatantele.

Modul de lucru. În tuburile de electroreză, umplute cu gel de poliacrilamidă se aplică cîte 50µl din fiecare probă (9) și se realizează separarea electroforetică, după modul descris în Experiența 3.1.

La sfîrșitul migrării, gelurile sînt scoase din tuburi și se incubează cu reactivul de developare timp de 10 minute la 37°C, în lumina obscură.

Electroforegramele se fotografiază sau se desenează. Se notează cu mare atenție poziția fiecărei benzi, viteza de developare, intensitatea finală și gradul de spațiere a izoenzimelor.

Experiența 43. EVIDENȚIEREA IZOENZIMELOR PEROXIDAZEI DIN HREAN

Principiul metodei. Izoenzimele peroxidazei din hrean sînt separate prin electroforeză în gel de agar (1,5%). Vizualizarea celor 7 izoenzime se realizează în prezența unui substrat donor de hidrogen (benzidina)

și a unui substrat acceptor de hidrogen (peroxidul de hidrogen). Benzile proteice cu activitate peroxidazică sînt evidențiate sub forma unor benzi de culoare albastră, datorită benzidinei oxidate.

Reactivi și soluții.

1. Reactivii și soluțiile pentru o separare electroforetică în gel de agar (v. Experiența 3.2.) ;
2. Soluție tampon acid acetic — acetat de sodiu 0,1 M, pH 4,7 ;
3. Soluție apă oxigenată 1%, preparată în tampon 2 ;
4. Ractiv benzidină (v. Experiența 64) ;
5. Reactiv de developare : o parte soluție 3 + o parte reactiv benzidină + o parte soluție tampon 2 ;
6. Extract proteic total (1 g pudră acetonică obținută din hrean mojarat cu 10 ml apă distilată, extracție o oră la 4°C, centrifugare la 3 000 r.p.m., timp de 10 minute ; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. După terminarea migrării electroforetice, plăcile cu gel de agar sînt scoase din tancul electoforetic (c. Experiența 32) și incubate în reactivul de developare.

Electroforegramele se fotografiază sau se desenează. Se notează poziția fiecărei benzi, direcția de migrare (anod sau catod), viteza de developare, intensitatea finală și gradul de spațiere a izoenzimelor.

Experiența 44. EVIDENȚIEREA IZOENZIMELOR CATALAZEI

Principiul metodei. Izoenzimele catalazei, din hepatopancreasul de melc, sînt separate prin electroforeză în gel de agar. După terminarea electroforezei gelurile sînt incubate cu o soluție tamponată de substrat și apoi în soluția developată (fericianură de potasiu + clorură ferică). H_2O_2 reduce fericianura la ferocianură, care reacționează cu $FeCl_3$ formînd complexul albastru de Berlin. Benzile proteice cu activitate catalazică de culoare galbenă se disting pe fondul verde-albastru al geluui.

Reactivi și soluții

1. Reactivii și soluțiile pentru o separare electroforetică în gel de agar (v. Experiența 32) ;
2. Soluția tampon KH_2PO_4—K_2HPO_4 0,01 M, pH 7 ;
3. Soluție apă oxigenată 0,003% preparată în tampon 2 ;
4. Soluție $FeCl_3$ 2% ;
5. Soluție $K_3(Fe(CN)_6)$ 2% ;
6. Reactiv de developare : se amestecă o parte soluție 4 cu o parte soluție 5 ;
6. Extract proteic total (1 g hepatopancreas de melc este triturat cu 10 ml soluție NaCl 0,3%, extracție o oră, centrifugare la 3 000 r.p.m./15 minute — se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. După terminarea migrării electroforetice, plăcile cu gel sînt spălate 45 minute cu apă distilată pentru a îndepărta soluția tampon. Gelurile sînt apoi transferate în soluție 3, ținute 10 minute și plasate în reactivul de developare. Imediat apar izoenzimele catalizei de culoare galbenă pe fondul albastru-verde al gelului.

Experiența 45. EVIDENȚIEREA IZOENZIMELOR AMILAZEI

Principiul metodei. Amidonul este înglobat în gelul de agar. Izoamilazele reacționează cu amidonul — proces care poate fi urmărit prin colorare cu o soluție de iod în iodură. Regiunile cu activitate enzimatică sînt mai decolorate, datorită produșilor de hidroliză a amidonului.

Reactivi și soluții

1. Gelul de agar — amidon utilizat este format din : 2,5 g agar, 1 g amidon, 100 ml apă distilată și 100 ml tampon electroforeză, încălzit la fierbere pînă devine limpede și turnat pe plăci (ca în modul descris la Experiența 32) ;

2. Soluțiile tampon electroforeză : 9.09 g veronal sodic și 1,3 g acid 5,5'—dietilbarbituric sînt dizolvate în apă distilată pînă la un volum final de 1 000 ml ;

3. Soluție tampon substrat, pH 6,9 : 590 g acetat de sodiu + 1,47 g veronal sodic + 1,4 g NaCl + 780 mg $CaCl_2$ se dizolvă în apă distilată, apoi se adaugă 62 ml HCl 0,1 N și se aduce la un volum final de 250 ml cu apă distilată ;

4. Soluția de developare : 45 ml iod 0,1 N cu 55 ml etanol absolut ;

5. Extract proteic total (1 g hepatopancreas de la molusca marină *Mya arenaria* este triturat cu 5 ml apă distilată, centrifugare 10 minute la 6 000 r.p.m. — se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Tancul de electroforeză este umplut cu soluția tampon 2. După introducerea plăcilor cu gel și aplicarea probei, electroforeza este condusă la 18mA și 200 V timp de 5 ore.

După terminarea electroforezei, plăcile sînt bine spălate cu apă distilată, apoi cu soluție tampon 3, și sînt incubate în aceasta din urmă timp de 15 minute la 37°C .Developarea se efectuează cu ajutorul soluției alcoolice de iod, cînd gelul este uniform colorat, rămînînd decolorate numai regiunile cu activitate amilazică. Alcoolul din soluția de developare fixează amidonul.

Experiența 46. EVIDENȚIEREA IZOENZIMELOR CELULAZEI

Principiul metodei. Carboximetil-celuloza este înglobată în gelul de poliaclinamidă. După separarea electroforetică, gelurile sînt incubate în condiții optime pentru ca benzile cu activitate celulazică să reacționeze asupra CM-celulozei din gel. Reacția enzimatică este stopată cu H_2SO_4 60%, iar developarea se realizează cu o soluție de iod în iodură.

Reactivi și soutii.

1. Gelurile conțin 8% poliacrilamidă și 0,05% CM-celuloză (în soluția *B* din Experiența 31 ; se mai adaugă 0,05 g CM—celuloză" ;

2. Soluția tampon electrod este aceeași cu cea descrisă în Experiența 31 ;

3. Soluție tampon NaH_2PO_4—Na_2HPO_4 0,2 M, pH 6,0 ;

4. Soluție H_2SO_4 60% ;

5. Reactiv de developare (iodură de potasiu 2% și iod 0,2% în apă distilată) ;

6. Extract proteic total (1 g hepatopancreas de la melcul *Helix pomatia* este triturat cu 10 ml apă distilată; extracție o oră la 4°C; centrifugare 10 minute la 5 000 r.p.m.; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Pe gelurile de poliacrilamidă în care s-a înglobat CM—celuloză se aplică probe de 0,1 ml extract proteic total ce conține 20% zaharoză (200—300 μg proteină). Electroforeza este condusă la 4°C, timp de două ore, la o intensitate a curetnului electric de 5 mA/tub.

După terminarea electroforezei gelurile sînt scoase din tuburi și incubate 10 minute la 37°C în soluție tampon 3. Incubarea gelurilor cu tampon fosfat pe perioade de timp mai mare de 10 minute poate duce la difuzia substratului și enzimei din gel în tamponul extern.

Reacția enzimatică este stopată cu H_2SO_4 60%, prin incubarea gelului timp de 5—10 minute în această soluție. După îndepărtarea acidului, gelurile sînt spălate cu apă distilată și lichidul decantat imediat. Soluția de developare este adăugată în eprubetele cu geluri și ținută 30—60 minute la temperatura camerii. O colorare mai rapidă are loc dacă gelurile sînt incubate la 37°C. La sfîrșitul perioadei de incubare, soluția de developare este decantată și excesul de colorant este spălat cu apă distilată.

Izoenzimele celulazei apar ca niște benzi alb-gălbui pe un fond galben-maroniu.

Experiența 47. EVIDENȚIEREA IZOENZIMELOR FOSFATAZEI ALCALINE

Principiu metodei. Izoenzimele fosfatazei alcaline din țesutul hepatic al suinelor sînt separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. În detectarea activității izoenzimelor se folosește în calitate de substrat α-naftilfosfatul. αnaftolul, produs în urma reacției enzimatice, este pus în evidență printr-un proces de diazotare cu 4-amino-2,5-dietoxibenzanilidă (Fast blue BB).

Reactivi și soluții

1. Reactivii și soluțiile pentru o separare electroforetică în gel de poliacrilamidă (v. Experiența 31);
2. Soluție tampon veronal sodic—HCl 0,02 M, pH 9,1;
3. Reactiv de developare: 0,25 mg αnaftilfosfat + 30 mg sare de diazoniu (Fast blue BB) + 50 mg $CaCl_2$ sînt dizolvate și aduse la un volum final de 100 ml cu soluție tampon 1;
4. Soluție acid acetic 3,5%;
5. Extract proteic total (1 g ficat este triturat cu 10 ml soluție tampon Tris-HCl 0,005 M, pH 8,2; extracție o oră; centrifugare la 5 000 r.p.m. timp de 15 minute; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Gelurile scoase din tuburile de electroforeză sînt spălate de trei ori cîte 15 minute cu soluție tampon 2. După efectuarea acestei spălări, gelurile sînt introduse în reactivul de developare și ținute timp de 2 ore la 37°C. Izoenzimele fosfatazei alcaline apar sub forma unor discuri de culoare neagră. Fixarea zonelor proteice cu activitate enzimatică și spălarea finală a gelurilor pentru îndepărtarea colorantului legat nespecific se realizează cu ajutorul soluției de spălare 4.

Principiul metodei. Izoenzimele superoxid dismutazei din ficat sau dintr-un extract proteic obținut din *E. coli* sînt separate electroforetic în gel de poliacrilamidă. Substratul reacției enzimatice este generat în mediu prin fotoreducerea riboflavinei. Flavina redusă fotochimic reduce o sare de tetrazoliu (Nitro Blue Tetrazolium — Nitro BT) la un formazan colorat în albastru. Superoxid dismutaza, descompunînd radicalii superoxid, inhibă reducerea sării de tetrazoliu. Izoenzimele superoxid dismutazei apar ca niște benzi decolorate pe fondul albastru al gelului.

Reactivi și soluții.

1. Soluția de developare conține : 25 ml soluție tampon K_2HPO_4—KH_2PO_4 36 mM, pH 7,8 + 2 ml soluție EDTA Na_2 0,1 M + 1 ml soluție Nitro BT 1,5 mM + 0,5 ml soluție riboflavină 0,12 mM.
2. Soluție de spălare : acid acetic 7%.

Modul de lucru. Gelurile scoase din tuburile de electroforeză sînt plasate în eprubete umplute cu soluția de developare și sînt iluminate 20 minute la o lampă UV.

După colorarea gelului în albastru, se spală cu soluție de acid acetic 7%.

CAPITOLUL V

METODE DE EVIDENȚIERE ȘI DOZARE A PROTEINELOR

Proteinele sînt principalii constituenți ai celulelor și prezintă un număr de funcții importante care stau la baza vieții. Fiecare proteină are o structură unică — secvența ei de amino-acizi fiind caracteristică speciei și în cîteva cazuri, fiind specifică pentru un organ sau țesut particular. Această secvență a unei proteine este reprodusă identic în urma diviziunii celulare. Măsurători fizice au arătat că proteinele globulare nu sînt reprezentate prin catene polipeptidice extinse ci sînt structuri compacte înalt pliate. O descriere moleculară a chimiei unei proteine implică cunoașterea secvenței de aminoacizi a acesteia (structură primară) și analiza detaliată a conformației catenei polipeptdice și a poziției radicalilor substituenți ai lanțului de bază. Pentru a aprecia aranjamentul aminoacizilor în proteine globulare este necesară examinarea schițelor de difracție a razelor X la o înaltă putere de rezoluție (1,5-2Å). Aceste hărți ale densităților de electroni trebuie să reprezinte diferite nivele ale celulei elementare dintr-un cristal de proteină. Aceste densități de electroni tridimensionale sînt analizate, în acord cu secvența de aminoacizi, pentru a determina coordonatele atomilor fiecărui rest de aminoacid. Cu astfel de informații se poate constitui un model molecular al structurii tridimensionale a proteinelor. Astfel de analize de difracție a razelor X au fost efectuate pe un număr de proteine care diferă prin funcția lor biologică, mărimea și numărul de catene polipeptidice per moleculă. Aceste studii au arătat că proteinele globulare sînt compacte, înalt pliate, între catenele laterale ale resturilor de aminoacizi fiind sabilite un număr de interacții fizice.

Proteinele fibrilare au o structură secundară mult mai ordonată decît cele globulare. Catenele polipeptidice ale proteinelor fibrilare presupun fie numai o structură α-helicală, fie numai o β-structură. α-helixul este caracteristica structurală a proteinelor din clasa α-keratinei, în timp ce β-structura este găsită în proteina mătăsii. O proteină globulară nu poate fi descrisă printr-un singur tip de structură secundară, ci printr-o conformație care include segmente α-helicale, elemente de β-structură și regiuni cu structuri nerepetitive sau neregulate.

Experiența 49. ABSORBȚIA ÎN ULTRAVIOLET A PROTEINELOR

Absorbția în UV a soluțiilor proteice se datorește resturilor de triptofan și tirozină — într-un grad mai mic — fenilalaninei. pH solu-

ție are un pronunțat efect asupra maximului de absorbție și măsurătorile spectrofotometrice se realizează de obicei în mediu alcalin.

Determinarea proteinelor prin metoda Waddell este bazată pe măsurători diferențiale ale densităților optice la 215 nm și 225 nm. Soluția proteică este diluată cu NaCl soluție 0,9% pînă cînd densitatea optică la 215 nm este mai mică decît 1,5. Diferența $D.O._{215}$ nm — $D.O._{225}$ nm multiplicată cu 144 și cu factorul de diluție dă concentrația proteică din probă, exprimată în μg/ml.

Warburg și Christian au determinat absorbția la 260 nm și 280 nm a unor amestecuri cunoscute de acizi nucleici cu proteine și compilînd datele au demonstrat posibilitatea de a determina cantitatea de proteină dintr-o probă necunoscută, din citirile la cele două lungimi de undă. Pentru a evita utilizarea tabelelor sau graficelor, Kalckar introduce formula :

$$\text{proteină (mg/ml)} = 1{,}45 \times D.O._{280} - 0{,}74 \times D.O._{260}$$

Pentru ca, utilizînd această metodă, să se obțină valori comparabile cu alte metode, este strict necesar ca acizii nucleici să nu depășească 20% din conținutul proteinelor.

Reactivi și soluții.

1. Soluție de albumină serică bovină 1% ,preparată în apă distilată.

2. Extract proteic total obținut prin centrifugarea unui omogenat (1 g țesut hepatic bovin / 10 ml apă distilată).

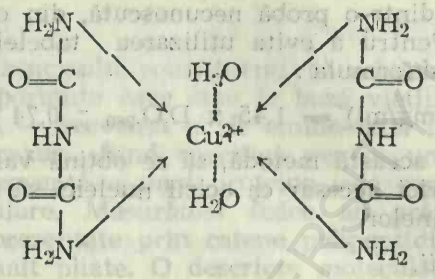
Modul de lucru. Din soluția 1 se efectuează diluții după cum urmează :

ml soluție 1	ml apă distilată	mg albumină
0,1	1,9	1
0,2	1,8	2
0,4	1,6	4
0,6	1,4	6
0,8	1,2	8
1,0	1,0	10

Probele sînt măsurate la 280 nm. Se trasează o curbă etalon indicînd pe abscisă mg proteină, iar pe ordonată $D.O._{280}$ — ce poate fi folosită în determinarea concentrației proteice în preparate pure.

Se citesc densitățile optice la 260 nm și 280 nm, față de apă pentru extractul proteic total diluat corespunzător. Valorile densităților sînt introduse în formula lui Kalckar, iar rezultatul obținut este multiplicat cu factorul de diluție.

Principiul metodei. Sulfatul de cupru, în mediu bazic, reacționează cu substanțele care conțin două sau mai multe legături peptidice formînd un complex violet. Intensitatea culorii este o măsură a numărului de legături peptidice prezente în proteină. Numele acestei metode vine de la compusul biuret H_2-CO-NH-CO-NH_2 care dă o reacție pozitivă tipică. Reacția nu este absolut specifică pentru legăturile peptidice, deoarece compușii conținînd două grupări carbonil legate printr-un atom de azot sau de carbon dau rezultate similare.



Metoda este utilizată pentru determinarea unor cantități relativ mari de proteine (1—20 mg).

Reactivi și soluții

1.Soluție standard proteică (5 mg/ml) albumină serică bovină, preparată extemporaneum ;

2. Reactiv biuret (se dizolvă 3 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ și 9 g tartrat de sodiu și potasiu în 100 ml soluție NaOH 0,2 M — se adaugă 5 g KI și se aduce la 1 litru cu NaOH soluție 0,2 M) ;

3. Extract proteic total (preparat ca la Experiența 49).

Modul de lucru

În 6 eprubete se pipetează :

	ml soluție 1	ml apă distilată	Proteină mg/2 ml
1	0	2,0	0
2	0,1	1,9	0,5
3	0,5	1,5	2,5
4	1,0	1,0	5,0
5	1,5	0,5	7,5
6	2,0	0	10,0

și 3 ml reactiv biuret. Probele se agită energic, se incubează timp de 10 minute la 37°C și după răcire se colorimetrează la 140 nm față de apă. Se construiește o curbă etalon trasînd pe abscisă mg/2 ml proteină — iar pe ordonată D.O.$_{540}$ nm. Se determină concentrația proteică în extractul proteic total 3, incubînd 2 ml preparat cu 3 ml reactiv biuret la 37°C timp de 10 minute. După răcire, proba se colorimetrează la 240 nm față de apă — iar densitatea optică măsurată este transformată în concentrție proteică (mg/2 ml) cu ajutorul curbei etalon. Dacă intensitatea culorii complexului format este prea puternică, se procedează la diluarea preparatului proteic pînă cînd densitatea optică măsurată se încadrează în curba etalon. Valorile obținute ulterior trebuie multiplicate prin factorul de diluție.

Experiența 51. HIDROLIZA PROTEINELOR

Principiul metodei. Cînd o proteină este hidrolizată, ea este scindată mai întîi în polipeptide, apoi în peptide din ce în ce mai mici, pînă la aminoacizi. Aceste modificări pot fi urmărite cu ajutorul reacției biuretului.

Reactivi și soluții

1. Soluție ovalbumină 2%;
2. Soluție pepsină 0,5%;
3. Soluție pancreatină 0,5%;
4. HCl conc.

Modul de lucru. În 7 eprubete, numerotate de la 1—7 se pipetează:

1—2 ml soluție ovalbumină 2% + 2 ml soluție pepsină 0,5%;
2—2 ml soluție ovalbumină 2% + 2 ml soluție pepsină 0,5% + o picătură HCl conc.;
3—2 ml soluție ovalbumină 2% + 2 ml soluție pancreatină 0,5%;
4—2 ml soluție ovalbumină 2% + 2 ml soluție pancreatină 0,5% + o picătură HCl conc;
5—4 ml soluție ovalbumină;
6—4 ml soluție pepsină;
7—4 ml soluție pancreatină.

Se incubează cele 7 eprubete la 37°C timp de o oră și se determină în fiecare concentrație proteică cu ajutorul metodei biuretului — la timpul zero (se scot cîte 2 ml proteină înainte de a începe incubarea!) și după o oră de incubare.

Se comentează rezultatele.

Experiența 52. DOZAREA PROTEINELOR PRIN METODA LOWRY

Principiul metodei. Dozarea proteinelor (domeniu 25—500 μg) se bazează pe formarea unui complex cupric cînd proteina reacționează cu un reactiv alcalin de cupru (reacția biuretului) și pe reducerea fosfomolibdaților și fosfowolframaților din reactivul Folin-Ciocâlteu de către compușii fenolici din proteină (în special tirozina).

Soluții și reactivi

1. Reactivul Folin-Ciocâlteu. (Într-un balon de refluxare se introduc pe rînd: 100 g $Na_2WO_4.2\ H_2O$ + 25 g $Na_2MoO_4.2\ H_2O$ care se dizolvă în circa 700 ml apă distilată, după care se adaugă 50 ml H_3PO_4 85% și 100 ml HCl conc. și se refluxează la flacără 10 ore. Apoi se adaugă 150 g Li_2SO_4 dizolvat parțial în 50 ml apă și cîteva picături de brom. Amestecul se fierbe 15 minute fără refrigerent, se răcește la temperatura camerii, se diluează la 1 litru și se filtrează. Reactivul de culoare galbenă trebuie ținut într-o sticlă brună, etanșă, curată, la 4°C. (Reactivul este extrem de ușor redus, cînd devine verzui). *Înainte de întrebuințare se diluează o parte reactiv + 10 părți apă distilată.*

2. Reactiv alcalin de cupru.. A — Na_2CO_3 anh. soluție 10%, în NaOH soluție 0,5 N ; *B* — Soluție 0,5% $CuSO_4.5\ H_2O$ în citrat de sodiu, soluție 1%. Înainte de întrebuințare se amestecă 10 părți reactiv *A* cu 1 parte reactiv *B*.

3. Soluție standard de albumină serică bovină 10 mg%, preparată în apă ;

4. Extract proteic total (preparat ca la Experiența 49).

Modul de lucru. 1 ml preparat proteic, 1 ml reactiv alcalin de cupru se amestecă bine (!) și se lasă să stea 10 minute la temperatura camerii pentru formarea proteinatului de cupru. După aceea se adaugă 3 ml reactiv Folin-Ciocâlteu (diluat 1 : 10).

Probele se agită energic și se incubează 10 minute la 50°C, se răcesc și se colorimetrează la 660 nm față de apă distilată.

Construirea curbei etalon. Din soluția standard de albumină serică bovină (3) se realizează diluții, după cum urmează :

ml soluție albumină (3)	ml apă distilată	μg albumină în 1 ml
0	1,0	0
0,1	0,9	10
0,2	0,8	20
0,3	0,7	30
0,4	0,6	40
0,5	0,5	50
0,6	0,4	60
0,7	0,3	70
0,8	0,2	80
0,9	0,1	90
1,0	0	100

În fiecare probă se adaugă cîte 1 ml reactiv alcalin de cupru, se incubează 10 minute la temperatura camerii, apoi se adaugă cîte 3 ml reactiv Folin Ciocâlteu diluat 1 : 10, se agită energic și se incubează 10 minute la 50°C. După răcirea probelor, ele se colorimetrează la 660 nm față de apă distilată. Se realizează o curbă etalon trasînd pe abscisă μg/ml proteină, iar pe ordonată $D.O._{660}$.

Calculul rezultatelor. Densitățile optice ale probelor cu soluții de proteină a căror concentrație dorim s-o determinăm, sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul curbei etalon. Dacă aceste densități optice sînt mai mari decît cele din curba etalon, se procedează la diluarea preparatului proteic. În calculul ulterior al concentrației se ține seama de factorul de diluție.

De exemplu, un preparat proteic a fost diluat 1 la 10 și apoi din nou 1 la 10. Se determină în cazul acestui preparat diluat o densitate optică de 0,28 care corespunde pe curba etalon unei concentrații de 15 μ/ml. Prin urmare, preparatul nediluat prezintă o concentrație proteică de $15 \times 100 = 1\,500$ μg/ml = 1,5 mg/ml.

Observații.

— Reactivul alcalin de cupru se prepară extemporaneum pentru a evita carbonatarea sau precipitarea hidroxidului cupric;

— Adăugarea reactivului Folin-Ciocâlteu trebuie efectuată rapid, deoarece în mediu alcalin reactivul este distrus;

— Pentru dezvoltarea culorii, amestecul de reacție trebuie să aibă pH 10; asigurarea alcalinității este condiția reproductibilității rezultatelor;

— Încălzirea probelor la 50°C timp de 10 minute poate fi înlocuită cu staționarea la temperatura camerei timp de 45 minute

— În concentrații mari afectează determinările: sulfatul de amoniu, glicina, hidrazina, sărurile de potasiu, acidul sulfosalicilic.

Experiența 53. DETERMINAREA AZOTULUI PRIN METODA KJELDAHL

Principiul metodei. Proteinele prezintă un conținut mediu în azot de 16%, ceea ce permite determinarea cantitativă a lor. Prin această metodă se estimează azotul total — deci și azotul care există în acizi nucleici, unele lipide, creatină, uree etc. Deci azotul proteic este determinat prin diferența dintre azotul total și azotul neproteic. Cantitatea de azot neproteic se determină prin precipitarea proteinelor cu un agent adecvat și determinarea conținutului în azot al filtratului.

Compușii organici care conțin azot sînt descompuși la sulfat de amoniu în prezența H_2SO_4 conc. și a unui catalizator: SeO_2, $CuSO_4$ sau K_2SO_4. În prezența unui exces de NaOH soluție concentrată este eliberat amoniacul care este captat cu ajutorul unei soluții de acid boric. Cantitatea boratului de amoniu formată este determinată titrimetric.

Reactivi și aparatură

1. Reactiv acid (se dizolvă 10 g $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$ și 10 g SeO_2 într-un amestec de 750 ml acid sulfuric conc. și 250 ml acid ortofosforic conc.)
2. Soluție saturată de acid boric;
3. Soluție NaOH 40%;
4. Soluție standardizată de HCl (aproximativ 0,025 M);
5. Indicator: o parte roșu metil și 3 părți verde de bromcrezol;
6. Flacoane Kjeldahl, alambic Markham, generator de vapori.

Modul de lucru. Se montează instalația din figura 5.1.

Se încălzește apa din generatorul de vapori. Se lasă vaporii să treacă 10 minute prin instalație. Se golește vasul de distilare și se lasă din nou vaporii să treacă lent prin instalație.

Se umple vasul conic cu o cantitate suficientă dintr-o soluție saturată de acid boric, pentru a acoperi capul condensatorului și se adaugă cîteva picături de indicator.

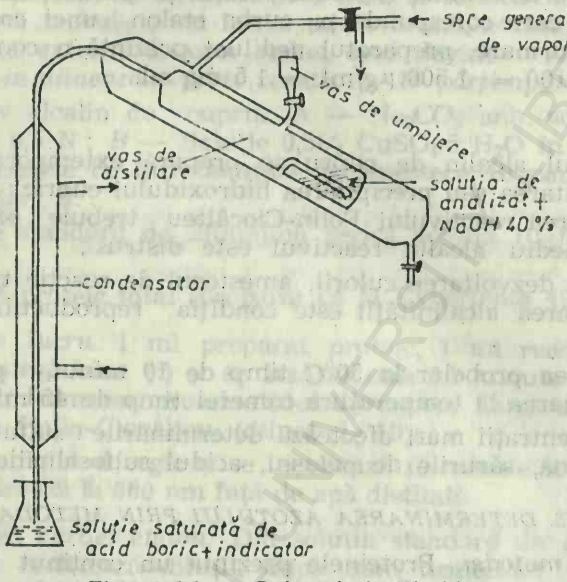


Figura 5.1. — O instalație Markham

În vasul de umplere se pipetează 5 ml soluție de sulfat de amoniu de o concentrație necunoscută și deschizîndu-se robinetul se toarnă lent această soluție în vasul de distilare. Se adaugă 5 ml NaOH soluție 40% în vasul de umplere, se deschide robinetul și se lasă să curgă în cantități mici, în vasul de distilare.

Amestecul este distilat, prin antrenare cu vapori, aproximativ 5 minute pînă se colectează 25 ml distilat. Se spală condensatorul în distilat. Se titrează distilatul cu HCl soluție standard.

Calculul rezultatelor. La 1 mol HCl corespunde 1 ml NH_3 și 14 g azot.

Dacă x este molaritatea HCl, iar y este numărul de ml folosiți de titrare :

$y \cdot x =$ mmoli amoniac

$y \cdot x \cdot 14 =$ mg azot/5 ml soluție de sulfat de amoniu.

Rezultatele trebuie în final reprezentate ca :

$y \cdot x \cdot 14 \cdot 200 =$ mg azot/1 000 ml soluție sulfat de amoniu.

Determinarea azotului total din serul sanguin. Într-un vas micro-Kjeldahl se pipetează 0,25 ml ser sanguin și 2 ml reactiv acid (1) și se adaugă o mică cantitate de porțelan poros. În paralel, se realizează un martor conținînd 2 ml reactiv acid. Într-o nișă, pe o baie de nisip se încălzește cu grije vasul 5 minute, iar apoi se crește temperatura pînă cînd amestecul începe să fiarbă. Se continuă fierberea 2—4 ore, după care la amestecul respectiv se adaugă, sub agitare constantă, 5 ml apă. Se ransferă cantitativ amestecul prin vasul de umplere, în vasul de distilare al aparatului Markham. Se spală vasul de umplere cu apă distilată, iar apele de spălare se trec tot în vasul de distilare. Se adaugă 10 ml NaOH 40% prin vasul de umplere în cel de distilare și se continuă determinarea în modul descris anterior. Se repetă experimentul pentru a determina conținutul în azot al martorului.

Se calculează conținutul în azot total al serului sanguin și se exprimă rezultatele în g azot/100 ml ser.

Considerîndu-se că azotul neproteic din serul sanguin este 3% din conținutul azotului total din ser, se va calcula azotul proteic.

Experiența 54. DETERMINAREA AZOTULUI PRIN METODA NESSLER

Principiul metodei. Reactivul N e s s l e r (iodură mercurică de potasiu în mediu alcalin) este utilizat pentru determinarea colorimetrică a azotului anorganic în concentrații variind în domeniul 5—100 μg N. Compușii organici sînt transformați în sulfat de amoniu, în prezența H_2SO_4 conc. și catalizator (v. procedeul K j e l d a h l). Reactivul N e s s l e r se adaugă la o parte alicotă din amestecul mineralizat și reacționează cu sare de amoniu formînd un sol coloidal colorat, stabilizat de guma arabică.

Reactivi și aparatură

1. Reactivul N e s s l e r (La 50 g KI dizolvate în 50 ml apă se adaugă o soluție saturată de $HgCl_2$ pînă se formează un precipitat permanent. Se adaugă 200 ml NaOH 5 M și se diluează la 1000 ml. Se decantează lichidul clar);
2. Soluție guma arabică 0,2%;
3. Reactiv acid (v. Experiența 53);
4. Soluție standard de sulfat de amoniu 100 μg N/ml;
5. Cazeină;
6. Soluție NaOH 40%.

Construirea curbei standard pentru azot. Din soluția standard de sulfat de amoniu se prepară diluții după cum urmează:

ml soluție standard	ml apă	μg N probă
0	5,00	0
0,1	4,90	10
0,2	4,80	20
0,3	4,70	30
0,4	4,60	40
0,5	4,50	50
0,75	4,25	75
1,0	4,00	100

În fiecare probă se adaugă 0,5 ml reactiv Nessler și 0,2 ml gumă arabică. După amestecare energetică, probele se lasă 15 minute la temperatura camerii pentru dezvoltarea culorii. Se citește densitatea optică la 480 nm a probelor 2—8 față de proba 1 și se trasează o curbă etalon pentru dozarea azotului.

Dozarea cantității de azot din cazeină. Se cîntăresc cu precizie 30—50 mg cazeină și se transferă într-un vas Kjeldahl, fiind supus transformării în $(NH_4)_2SO_4$ (v. Experiența 53). Se prepară și un martor.

După terminarea kjeldahlizării, se lasă proba (și martorul) la rece, se adaugă 5 ml apă, se ajustează pH la 5 prin adiția de NaOH 40%. Se transferă cantitativ amestecul într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn.

Se pipetează în două probe paralele cîte 1 ml cazeină digerată și cîte 1 ml martor. Se aduc pînă la 5 ml cu apă distilată și se continuă determinarea ca în modul descris la curba etalon.

Se determină g N/100 g cazeină.

Se determină puritatea (%) probei de cazeină, presupunîndu-se că conținutul în azot al cazeinei este de 16%.

Experiența 55. DOZAREA PROTEINELOR CU AMIDO BLACK, PRIN METODA DESCRISĂ DE FÜHR ȘI HINZ

Principiul metodei. Cantitatea de Amido black legată la proteine este direct proporțională cu concentrația proteică. Metoda este sensibilă pentru analiza unor probe care conțin 0,01 mg proteină, fiind aplicabilă determinării conținutului proteic din fluide corporale cu mici cantități de proteine (umoarea apoasă, fluidul cerebrospinal etc.).

Reactivi și soluții

1. Soluție saturată de Amidon black 10 B, preparată într-un amestec acid acetic glacial — metanol 1 : 9 ;
2. Soluție de spălare : acid acetic glacial-metanol 1 : 9 ;
3. Soluție NaOH 0,1 N.

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se pipetează :

0,2 ml soluție proteică
1,0 ml apă
1,0 ml soluție de Amido black

se agită energic și se pipetează încă 4,0 ml soluție Amido black.

După agitare energetică, amestecul este lăsat să stea la temperatura camerii 20 minute, apoi este centrifugat la 2 000 r.p.m. timp de 10 minute. Supernatantul este aruncat, iar sedimentul este spălat cu soluția 2 pînă cînd apele de spălare nu mai sînt colorate.

În final sedimentul este dizolvat în 5 ml soluție NaOH 0,1 N și densitatea optică a probei este măsurată la 594 nm față de soluția 3.

Calculul rezultatelor.

$$D.O._{595nm} \times 105 = \text{mg proteină } \%.$$

Experiența 56. DETERMINAREA HEMOGLOBINEI PRIN METODA DESCRISĂ DE COHEN ȘI SMITH

Principiul metodei. În mediu alcalin, hemul din hemoglobină este transformat în hematină, care este comparată cu o soluție standard.

Reactivi și soluții

1. Soluție standard de hemoglobină 0,075 g în 5 ml (Se defibrinizează o anumită cantitate de sînge uman sau bovin proaspăt recoltat. Se determină conținutul în oxigen și se diluează sîngele cu HCl 0,1 N pînă la un conținut de oxigen de 4 volume %. Diluația poate fi calculată utilizînd următoarea ecuație :

$$\frac{H \cdot V_1}{4} = V_2$$

unde H este conținutul în oxigen, exprimat în volume %; V_1 este volumul inițial de sînge, iar V_2 este volumul la care trebuie diluat sîngele pentru a ajunge la un conținut în oxigen de 4 vol %. Soluția stoc poate fi ținută la rece, într-o sticlă brună, cîteva luni. Se diluează 5 ml soluție stoc pînă la un volum final de 200 ml HCl 0,1 N. Această soluție are un conținut în oxigen de 0,1 vol % și 0,075 g hemoglobină în 5 ml. Soluția standard diluată trebuie preparată săptămînal).

2. Soluție HCl 0,1 N ;
3. Soluție NaOH 10% ;
4. Sînge

Modul de lucru. Se pipetează 0,05 ml sînge în 5 ml HCl 0,1 N se spală bine pipeta în soluția acidă. Eprubeta conținînd amestecul sînge-acid este incubată 10 minute pe o baie de apă la 38°C, după care se adaugă 0,5 ml soluție NaOH 10% și se amestecă energic.

Se măsoară densitatea optică a acestei probe la 520 nm ($D.O_{proba}$) și densitatea optică a soluției standard de hemoglobină 1, tratată cu 0,5 ml NaOH 10% ($D.O._{standard}$) — față de soluția 2.

Dacă sîngele conține puțină hemoglobină, se utilizează 0,1 ml sînge.

Calculul rezultatelor :

$$\frac{D.O._{proba}}{D.O._{standard}} \times 0{,}075 \times \frac{100}{0{,}05} \times \frac{100}{1\,000} = \text{g Hb/100 ml sînge}$$

Experiența 57. DETERMINAREA HEMOGLOBINEI CU REACTIV DRABKIN

Principiul metodei. Hemoglobina este transformată în cianmethemoglobină stabilă, care este dozată în raport cu un standard.

Reactivi și soluții

1. Soluție standard de hemoglobină 12 g în 100 ml (Se colectează 30 ml sînge și se defibrinizează. Se determină Fe în acest sînge și se calculează g Hb/100 ml. Se diluează cu apă la exact 12 g%).

2. Reactiv Drakin (Se dizolvă 2 g bicarbonat de sodiu, 104 mg cianură de potasiu și 396 mg fericianură de potasiu în apă distilată.

Se diluează la 2 000 ml și se păstrează maximum 30 zile într-o sticlă brună, la 4°C);

3. Sînge.

Modul de lucru. În trei eprubete se pipetează cîte 5 ml reactiv Drabkin. În eprubeta 1, se adaugă 0,02 ml apă; în 2 — 0,02 ml sînge și în 3 — 0,02 ml standard. Se amestecă și se lasă să stea 10 minute la temperatura camerii. Se citește D.O. la 540 nm, a probei 2 față de martorul 1 ($D.O._{proba}$) și a standului 3 față de martorul 1 ($D.O._{standard}$).

Calculul rezultatelor

$$\frac{D.O._{proba}}{D.O._{standard}} \times 12 = g \text{ hemaglobină în 100 ml sînge.}$$

Experiența 58. STANDARDIZAREA HEMOGLOBINEI

Principiul metodei. Sîngele este distrus cu un amestec de acizi minerali concentrați, iar Fe eliberat este redus, tamponat și complexat cu bipiridil și comparat cu o soluție standard de Fe, tratată similar.

Reactivi și soluții.

1. Reactiv acid de digerare (Se amestecă 300 ml HNO_3 conc. cu 150 ml $HClO_4$ și 15 ml H_2SO_4 conc.).

2. Reactiv de colorare tamponat. (Se dizolvă 200 mg 2,2′ — bipiridil în 4,5 ml acid acetic glacial într-un balon cotat de 250 ml. Se adaugă 15 g acetat de sodiu și 250 mg hidroxilamină HCl și se aduce la semn cu apă distilată. pH trebuie să fie aproximativ 5);

3. Standard de fer 0,1 mg/ml (Se dizolvă 100 mg sîrmă de Fe pur în soluție H_2SO_4 10% și se diluează cu apă distilată pînă la 1 000 ml).

Construirea curbei etalon. Se diluează 20 ml — 40 ml — 60 ml — 80 ml soluție standard 3 la 100 ml cu apă distilată. Aceste diluții vor conține 0,02 — 0,04 — 0,06 — 0,08 mg Fe/ml.

Se evaporă la sec cîte 1 ml din fiecare soluție diluată într-un pahar de 50 ml. Se pipetează în fiecare pahar cîte 10 ml reactiv de colorare tamponat, se amestecă bine și se lasă să stea 15 minute la temperatura camerii.

Se citesc densitățile optice a celor 4 preparate, la 520 nm față de apă. Se trasează o curbă etalon, indicînd pe abscisă mg Fe/ml — iar pe ordonată $D.O._{520nm}$.

Modul de lucru. În două pahare, notate 1 și 2, de cîte 100 ml se introduc cîte 3 ml reactiv acid de digestie. În paharul 1 se adaugă 0,1 ml sînge și se amestecă energic. Conținutul celor două pahare se evaporă la sec, se răcesc la temperatura camerii și se adaugă în fiecare cîte 10 ml reactiv de colorare tamponat. Se amestecă energic, și se lasă să stea 15 minute, sub agitare ocazională. Se citește densitatea optică la 520 nm a conținutului paharului 1, față de cel din paharul 2.

Calculul rezultatelor. Se transformă densitatea optică măsurată în mg Fe cu ajutorul curbei etalon. Concentrația în hemoglobină a sîngelui se determină cu ajutorul formulei :

$$\frac{\text{mg Fe/0,1 ml} \times 1\,000}{3{,}35} = \text{g Hemoglobină/100 ml sînge}$$

Experiența 59. DOZAREA PROTEINELOR DIN PLASMĂ ȘI SER

Principiul metodei. Proteinele din plasmă sînt fracționate, cu o soluție de sulfat de sodiu, în fibrinogen, albumină și globuline. Proteinele totale și aceste fracții proteice sînt determinate prin metoda Lowry (Exp. 52).

Reactivi și soluții

1. Soluție Na_2SO_4 30% ;
2. Soluție acid tricloracetic 20% ;
3. Soluție NaOH 10% ;
4. Plasmă ;
5. Ser ;
6. Reactivii pentru dozarea proteinelor prin metoda Lowry (v. Experiența 52).

Modul de lucru. Se determină *concentrația proteinelor totale* din plasma sanguină utilizînd metoda Lowry. Deoarece concentrația proteică din plasă este mult mai mare decît limita superioară de valabilitate a metodei Lowry (10—100 μg/ml proteină) se procedează la diluarea de aproximativ 700 ori a plasmei înainte de efectuarea determinării propriu-zise. În calcularea datelor experimentale obținute, se ține seama de factorul de diluție a probei.

Pentru determinarea cantității de *fibrinogen* din plasma sanguină, se precipită această proteină cu o soluție Na_2SO_4 11,25%, după cum urmează :

1 ml plasmă sanguină
1,5 ml apă distilată
1,5 ml soluție Na_2SO_4 30%

se amestecă energic, se incubează timp de 10 minute pe o baie de apă termostatată la 37°C și se centrifughează la 3 000 r.p.m. timp de 10 minute. Supernatantul (S_1) este folosit în determinările ulterioare, iar precipitatul este spălat cu o soluție de sulfat de sodiu 11,25% (2,5 ml apă distilată + 1,5 ml soluție Na_2SO_4 30%), se amestecă energic, se incubează din nou la 37°C timp de 10 minute și se centrifughează la 3 000 r.p.m./10 minute. Apele de spălare din supernatant se aruncă, iar fibrinogenul precipitat este redizolvat în NaOH soluție 10% la cald. După răcire, se adaugă 7,5 ml apă distilată — în soluție determinîndu-se concentrația proteică prin metoda Lowry. În calcularea rezultatelor se ține seama că fibrinogenul a fost precipitat din 1 ml plasmă.

În continuarea dozărilor, la 2 ml supernatant S_1 se adaugă 3 ml soluție Na_2SO_4 30%. Amestecul bine omogenizat este incubat la 37°C timp de 10 minute, apoi este filtrat pe un filtru cutat. Precipitatul care

reprezintă fracția globulinică este aruncat. Se păstrează filtratul, care conține albuminele.

La 2 ml filtrat se adaugă 3 ml apă distilată și 1 ml acid tricloracetic 20%. Se amestecă bine, iar albuminele precipitate pot fi separate prin centrifugare la 6 000 r.p.m./10 minute. Supernatantul se aruncă. Precipitatul proteinelor (albumine) este redizolvat în 0,5 ml NaOH soluție 10% și adus la un volum final de 8 ml. În acest preparat se dozează concentrația albuminelor folosind metoda Lowry ținînd seama de faptul că albumina a fost izolată din 0,2 ml plasmă.

Concentrația globulinelor se determină prin scădere:

Globuline = Proteine totale — (Fibrinogen + Albumine)

Rezultatele experimentale trebuiesc exprimate în grame de proteină la 100 ml plasmă.

Valori normale:

Albumine	4,5—5,5 g/100 ml
Globuline	1,5—3,5 g/100 ml
Fibrinogen	0,2—0,4 g/100 ml

Observație. Cînd dozările se fac în serul sanguin, dozarea fibrinogenului este omisă.

Globuline = Proteine totale — Albumine.

Experiența 60. DETECTAREA MODIFICĂRILOR CONFORMAȚIONALE ALE ALBUMINEI SERICE BOVINE PRIN MĂSURĂTORI DE VÎSCOZITATE

Principiul metodei. Concentrațiile mari de uree provoacă deplierea proteinelor datorită slăbirii legăturilor de tip hidrofob ce mențin structura terțiară. Aceste modificări din conformația proteică conduc la o moleculă mai puțin compactă cu o vîscozitate mai mare decît proteina

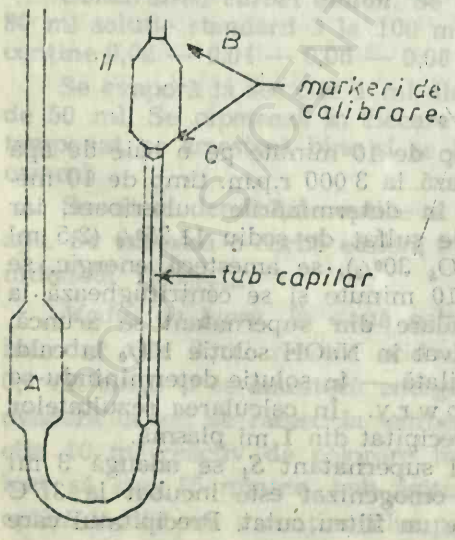


Figura 5.2. — Viscozimetru Ostwald

nativă. Aceste modificări în structura terțiară pot fi ușor urmărite cu ajutorul unui vîscozimetru Ostwald (Figura 5.2.), care constă dintr-un tub capilar prin care un volum cunoscut din soluția proteică este lăsat să curgă sub gravitate. Timpul necesar pentru curgerea întregii cantități de soluție proteică este măsurat — t_1 precum și același timp pentru un solvent — t_0. Vîscozitatea relativă este dată de ecuația :

$$\eta_r = \frac{\eta_1}{\eta_0} = \frac{t_1}{t_0} \times \frac{\rho_1}{\rho_0}$$

unde η_1 este vîscozitatea soluției proteice de densitate ρ_1 și η_0 este vîscozitatea solventului de densitate ρ_0. Dacă densitățile sînt considerate egale expresia se simplică la :

$$\eta_r = \frac{t_1}{t_2}$$

Einstein a arătat că, pentru molecule sferice, vîscozitatea relativă este raportată la concentrația moleculelor respective *(c)* și la volumul parțial specific $(\overline{V})$ prin relația :

$$\eta_r = 1 + 2{,}5 \times c \times \overline{V}$$

unde volumul parțial specific este volumul ocupat de molecula hidratată.

Reactivi și aparatură

1. Albumină serică bovină, soluție 1% în KCl 0,1 M și soluțiile de uree prezentate mai jos ;
2. Soluție KCl 0,1 M ;
3. Soluții de uree 0,5 M — 1 M — 2 M — 4 M — 6 M — și 8 M, preparate în soluția 2 ;
4. Vîscozimetru Ostwald ;
5. Baie de apă, termostatată la 30°C ;
6. Cronometru cu diviziuni de 0,1 s.

Observație. Deoarece vîscozitatea este funcție de temperatură, toate soluțiile și vîscozimetrul trebuie ținute într-un termostat, reglat la 30°C.

Modul de lucru. Se introduce vîscozimetrul în termostat, se controlează verticalitatea aparatului și se spală cu soluția 2.

Se pipetează exact 20 ml de soluție KCl 0,1 M, termostatată la 30°C, în bula A a ramurei I a vîscozimetrului. Se aplică o presiune pozitivă în ramura I, fie o presiune sucțională în ramura II, pînă cînd lichidul a atins nivelul, marcat prin B. Se îndepărtează sursa de presiune și se măsoară, cu o precizie de 0,1 s, timpul necesar lichidului de-a se scurge complet pînă la marca C. Se repetă experimentul de mai multe ori și se calculează timpul mediu de curgere.

Repetăm experimentul cu soluțiile de uree (3) pentru determinarea timpilor t_0 și cu soluțiile de albumină serică bovină dizolvate în

uree (t_1). Se calculează viscozitățile relative după timpul de curgere și se trasează un grafic al variației vîscozității albuminei cu concentrația de uree. Se comentează rezultatele.

De asemenea, se calculează volumul parțial specific al albuminei serice bovine în uree 8 M, utilizînd ecuația lui Einstein.

Experiența 61. EFECTUL pH ASUPRA CONFORMAȚIEI ALBUMINEI SERICE BOVINE

Reactivi și aparatură

1. Toți reactivii din experiența 60.
2. pH metru.

Modul de lucru. Utilizînd un vîscozimetru Ostwald se vor urmări modificările structurale ale albuminei dizolvate în soluție 0,1 M de KCl cînd pH acesteia este variat în domeniul 2—12.

Se comentează rezultatele.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL VI

METODE DE ANALIZĂ ENZIMATICĂ

Enzimele, fără excepție sînt proteine, fiind constituite fie numai din resturi de aminoacizi, legați prin legături peptidice, fie din catene polipeptidice și alte componente organice sau anorganice (coenzime, grupări prostetice). Acestea prezintă structuri spațiale complicate, care includ *centrul catalitic activ* — partea care realizează efectiv funcția biologică a acestor proteine.

Acești biocatalizatori accelerează viteza reacțiilor biochimice de 10^8—10^{11} ori prezentînd o capacitate catalitică superioară catalizatorilor chimici. Enzimele au un *număr de turnover* (numărul de molecule de substrat transformate de o moleculă de enzimă într-un minut) cuprins între 10^2 și 10^6 — majoritatea avînd această valoare egală cu 10^3. Reacții care în laboratoarele de chimie decurg în condiții speciale, de temperatură și presiuni ridicate, valori extreme de pH, în prezența enzimelor decurg în condiții moderate.

Activitatea catalizatorilor, indiferent de natura lor chimică, se caracterizează prin faptul că poate fi decelată cînd aceștia se găsesc în cantități extrem de mici, deși concentrația substratului (substratelor) asupra cărora acționează este relativ mare. La sfîrșitul reacției, atît catalizatorul chimic cît și enzima se regăsesc, din punct de vedere calitativ, într-o stare chimic neschimbată, putînd participa la un nou act catalitic.

Catalizatorii chimici (Pt, Co, Ni, Fe, Zn, Au, MnO_2, Al_2O_3) sînt substanțe relativ simple, în timp ce enzimele prezintă un grad deosebit de complexitate structurală, o singură configurație activă din punct de vedere catalitic — motiv pentru care sînt ușor denaturabile prin modificarea temperaturii, pH, prin acțiunea razelor ultraviolete, a ultrasunetelor, prin congelări și decongelări repetate etc. Cea mai esențială deosebire dintre enzime și catalizatorii chimici constă în înalta specificitate de acțiune a enzimelor, concretizată în capacitatea de a cataliza un singur tip de reacție biochimică (de oxidoreducere, de transfer a unei grupări chimice, etc.), uneori a unei singure substanțe chimice (specificitatea absolută de substrat).

Există șase clase de enzime: oxidoreductaze (1); transferaze (2); hidrolaze (3); liaze (4); izomeraze (5); ligaze sau sintetaze (6). Fiecare enzimă are un nume sistematic, o denumire de lucru prescurtată și un cod format din patru cifre. De exemplu, enzima *lactat: NAD^+ oxidoreductaza* are denumirea de lucru *lactat dehidrogenaza* și codul EC 1.1.1.27. Primul număr din cod indică faptul că enzima face parte din

clasa 1, a oxidoreductazelor. Al doilea număr indică subclasa enzimelor care acționează asupra unor substanțe donoare de hidrogen la nivelul grupării —CHOH. Al treilea număr indică subsubclasa enzimelor care utilizează NAD^+ sau $NADP^+$ în calitate de substrat acceptor de hidrogen. Ultimul număr al codului (în cazul nostru particular — 27) indică numărul enzimei catalogate în subsubclasa 1.1.1.

6.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Prezența unei enzime într-un amestec de reacție poate fi evidențiată și urmărită fie prin dispariția substratului, fie prin apariția unui produs de reacție. Enzima este incubată cu substratul, în condiții de concentrații, pH și temperatură strict controlate și din amestecul de reacție se scot la anumite intervale de timp probe, care sînt analizate. Fiecare „probă" în care este testată activitatea enzimatică este însoțită de un „martor", în scopul depistării reacțiilor chimice nespecifice și spontane care au loc independent de enzimă. Modul în care se realizează „martorul" variază, de aceea la fiecare experiment se vor da indicații în acest sens.

Dacă urmărim *variația în timp a vitezei enzimatice* se constată că la începutul reacției acest parametru cinetic crește linear, după care scade. Abaterea de la linearitate a vitezei de reacție în funcție de timp poate fi datorată fie inversării sensului reacției (echilibru este atins și reacția inversă devine mai importantă), fie scăderii în timp a concentrației substratului cînd enzima nu mai este saturată în acesta, fie inhibiției printr-un produs al reacției. Pentru a minimaliza aceste efecte, în cercetările de enzimologie se determină *viteza inițială de reacție* (v_0) cînd v crește liniar în timp.

Unități enzimatice. Activitatea enzimatică este frecvent exprimată în unități *(U)* astfel că *o unitate reprezintă cantitatea de enzimă ce catalizează transformarea 1 micromol de substrat într-un minut, în condiții definite.* Se admite exprimarea activității enzimatice în nmoli/minut sau pmoli/minut.

Unitatea internațională sistematică a activității enzimatice este *katal (kat) care reprezintă transformarea unui mol de substrat pe secundă.* Deoarece acest nou mod de exprimrae conduce la valori mari, se admite exprimarea activităților enzimatice și în microkatali (μkat), nanokatali (nkat) sau picokatali (pkat).

1 U = 1 /μmol/min
1 katal = 1 mol/s
1 U = /μkat/60 = 16,67 nkat

Puritatea unei enzime se exprimă prin *activitatea specifică,* care este numărul de unități enzimatice (U) pe mg proteină sau numărul de katali pe Kg proteină.

Activitățile relative ale enzimei pure sînt comparate cu *activitățile molare. Activitatea moleculară* sau *numărul de turnover* este numărul de molecule de substrat transformate într-un minut de o moleculă de enzimă în condiții optime.

Experiența 62. DOZAREA ACTIVITĂȚII ALCOOL DEHIDROGENAZEI. STUDIUL MERSULUI REACȚIEI ÎN TIMP

Alcool dehidrogenaza (EC 1.1.1.1.) catalizează reacția reversibilă de oxidare a alcoolilor și de reducere a aldehidelor și cetonelor, în prezența sistemului redox al coenzimelor NAD^+—NADH, conform reacției :

$$R—CH_2—OH + NAD^+ \rightleftharpoons R—CHO + NADH + H^+$$

Enzima izolată din țesutul hepatic de cal are o masă moleculară de 80 000, un pH izoelectric de 6,8 și este un dimer cu două tipuri de subunități : *E*, active față de etanol și *S*, active față de steroizi. Pe fiecare subunitate este un centru activ și doi atomi de Zn.

Enzima izolată din drojdie are o masă moleculară de 141 000, un pH izoelectric de 5,4 și este un tetramer. Pe fiecare subunitate există cîte un atom de Zn și două grupări tiol esențiale pentru procesul catalitic. catalitic.

Principiul metodei. Viteza reacției este determinată prin urmărirea creșterii valorii extincției amestecului de reacție la 340 nm, ca o măsură a reducerii NAD^+. *O unitate enzimatică reduce un micromol de NAD^+ într-un minut la 25°C, în condiții definite.*

Reactivi și soluții necesare

1. soluție tampon pirofosfat de sodiu 0,032 M, pH 8,8 ;
2. soluție etanol 2 M (12,12 ml etanol 95% se pipetează într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu soluția tampon 1) ;
3. soluție NAD^+ 0,025 M, preparată în soluția tampon 1 ;
4. Preparat proteic cu activitate alcool dehidrogenazică. (se omogenizează 1 g țesut hepatic bovin cu 50 ml apă distilată, extracție o oră la 4°C, centrifugare la 6 000 r.p.m., timp de 15 minute la —5°C se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. În două cuve de spectrofotometru, se pipetează :

1,5 ml soluție tampon pirofosfat (1) ;
0,5 ml soluție etanol (2) ;
1,0 ml soluție NAD^+ (3) ;
0,1 ml preparat proteic

în cuva *probă* și respectiv 1 ml tampon și 0,1 ml preparat proteic în cuva *martor*. Se determină densitatea optică la 340 nm a probei față de martor, la timpul zero și după 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 120 s, 180 s și 240 s de reacție.

Calculul rezultatelor. Se reprezintă grafic variația densității optice la 340 nm (ordonată) în funcție de timp (abscisă). Se determină porțiunea din curbă în care viteza crește proporțional în timp. Se calculează Δ D.O. 340/minut din porțiunea lineară inițială a curbei.

$$\text{Unități/ml} = \frac{\text{D.O.}_{340}/\text{min}}{6{,}2}$$

unde $6,2 \times 10^6$ cm^2/ml este coeficientul de extincție al NADH la 340 nm. În calculul unităților enzimatice dintr-un ml preparat proteic se ține seama și de factorul de diluție aplicat.

Activitatea specifică a preparatului se exprimă în Unități/mg proteină. Concentrația proteică a preparatului (4) se determină prin metoda spectrofotometrică (v. Experiența 49) și se exprimă în mg/ml. Dacă împărțim numărul unităților/ml la valoarea concentrației proteice, exprimate în mg/ml se obține activitatea specifică a preparatului.

Observație. Alcool dehidrogenaza purificată din drojdie este utilizată analitic pentru determinarea etanolului.

Experiența 63. DOZAREA ACTIVITĂȚII LACTAT DEHIDROGENAZEI

L—lactat : NAD^+ oxidoreductaza (EC 1.1.1.27.) catalizează reacția reversibilă :

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C{=}O \\ | \\ COOH \end{array} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{array} + NAD^+$$

Enzima izolată din țesuturile mamiferelor are o structură cuaternară tetrameră, constituită prin combinarea a două subunități diferite : *H* (predomină în mușchiul cardiac), *M* (predomină în mușchiul striat). Există cinci izoenzime cu structurile tetramere : H_4, H_3M, H_2M_2, HM_3 și M_4 care diferă prin proprietățile lor catalitice, fizice și imunologice. Subunitatea *H* predomină în țesuturile cu metabolism aerob, în timp ce *M* există preferențial în țesuturile cu metabolism anaerob.

Principiul metodei. Viteza de reacție este determinată prin scăderea densității optice la 340 nm, ca urmare a oxidării NADH. *O unitate enzimatică oxidează un micromol de NADH într-un minut la 25°C, în condiții definite.*

Reactivi și soluții necesare

1. Soluție tampon Tris—HCl 0,2 M, pH 7,3 ;
2. Soluție piruvat de sodiu 0,03 M, preparată în soluția tampon 1 ;
3. Soluție NADH 0,0066 M, preparată în soluția tampon 1 ;
4. Preparat proteic cu activitate lactat dehidrogenazică (se omogenizează 1 g țesut muscular striat de la *Carasius carasius* cu 50 ml apă distilată, extracție o oră la 4°C, centrifugare la 6 000 r.p.m., timp de 15 minute la —5°C. Se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. În cuva de cuarț a unui spectrofotometru se pipetează amestecul de reacție al probei :

2,8 ml soluție tampon Tris-HCl (1) ;
0,1 ml preparat proteic (4) ;
0,1 ml soluție NADH (3)

iar în cuva „martor" se pipetează :

2,9 ml soluție tampon Tris—HCl (1) ;
0,1 ml preparat proteic (4).

În ambele cuve se adaugă cîte

0,1 ml soluție piruvat de sodiu (2)

și se măsoară densitatea optică la 340 nm la *timpul zero* și după 15 s, 30 s, 45 s, 60 s, 120 s, 180 s, 240 s de reacție.

Densitatea optică la 340 nm caracteristică NADH scade în timpul reacției pe măsură ce coenzima redusă se oxidează.

Calculul rezultatelor. Reprezentarea grafică, calculul activității enzimatice, calculul activității specifice se face similar cu modul descris la experiența 62.

Observații

1. În organele umane, activitatea lactat dehidrogenazei scade în ordinea : rinichi ⟩ inimă ⟩ mușchi scheletic ⟩ pancreas ⟩ splnă ⟩ ficat ⟩ plămîn ⟩ ser ;

2. Lactat dehidrogenaza serică poate proveni din ficat, inimă, mușchi striat, eritrocite, tumori etc., activitatea acestei enzime crescînd cînd unul sau mai multe organe sînt vătămate ;

3. Prin studiul electroforetic al izoenzimelor lactat dehidrogenazei serice (v. Experiența 42) se pot face aprecieri aproximative asupra provenienței enzimei din ser ;

4. Valorile normale ale lactat dehidrogenazei serice sînt de pînă la 195 U/l, iar a enzimei din fluidul cerebrospinal de 4—10 U/l.

6.2. DOZAREA ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI

Termenul de *peroxidaze* include o grupă de *enzime specifice*, ca : NAD peroxidaza ,NADP peroxidaza, acid gras peroxidaza, citocrom peroxidaza, glutation peroxidaza și o grupă de *enzime nespecifice*, izolate din diferite surse, cu nomenclatura sistemică *Donor de hidrogen : H_2O_2 oxidoreductaza* și codul EC 1.11.1.7.

În prezenta experiență ne vom ocupa numai de ultima grupă de enzime. Peroxidaza catalizează dehidrogenarea unui mare număr de compuși organici, ca de exemplu : fenoli și amine aromatice, hidrochinone, în special derivați benzidinici. În particular pot fi menționați : *o*-crezonul, *o*-toluidina, guaiacolul, pirogalolul, acidul homovanilinic, *p*-hidrochinona, *o*- sau *p*-fenilen diamina, leucomalachitul verde, 2,6-diclorfenol indofenolul redus, 4,4'-diaminodifenil amina, benzidina, *o*-tolidina, di-*o*-anisidina etc.

Cu puține excepții, peroxidazele cu codul EC 1.11.1.7. sînt hemoproteine, catalizînd reacția :

$$H_2O + DH_2 \longrightarrow 2H_2O + D$$

Există însă și peroxidaze care acționează asemenea oxidazelor :

$$DH_2 + O_2 \longrightarrow D + H_2O_2$$

sau monooxigenazelor :

$$DO_2 + O_2 + NADPH \longrightarrow D\text{-}OH + NADP^+ + HO^-$$

Peroxidaze sînt găsite în hrean, ananas, smochine, cartofi, legme, grîu, tabac, în drojdii ,fungi şi în bacterii. La mamifere, au fost evidenţiate peroxidaze în leucocite, lapte, ficat, splină, uter, glande salivare, perete intestinal, mucoasa intesstinală, plămîn, glanda tiroidă — în fracţilie supernatant, microzomiale şi mitocondriale.

Cel mai bine studiată este peroxidaza din hrean, care este o glicoproteidă cu un conţinut de 18% zaharuri şi care conţine 1 mol de protohem IX. Enzima purificată din hrean are o masă moleculară de 40 200, un pH optim de acţiune la pH 6,0 şi un punct izoelectric la pH 7,2. Pe preparate pure de peroxidază se determină raportul de densităţi optice $D.O._{403nm}/D.O._{257nm}$, numit *Renheitzahl (RZ)*, ca un test de puritate al preparatului. RZ variază între 4,19 şi 2,50 — în cazul preparatelor enzimatice omogene RZ = 3,04.

Peroxidaza din hrean are 7 izoenzime, ce au proprietăţi catalitice similare, notate *A—1, A—2, A—3 şi B, C, D şi E*. Izoenzimele diferă prin pH optime, valorile K_M, gradul de inhibiţie cu HCN, etc.

Experienţa 64. DOZAREA ACTIVITĂŢII PEROXIDAZEI DIN HREAN, DUPA METODA BRAD ŞI COLAB.

Principiul metodei. Este determinată oxidarea benzidinei de către H_2O_2 — în prezenţa peroxidazei din hrean — în calitate de catalizator şi a unei cantităţi cunoscute de acid ascorbic, în calitate de indicator redox. În principal, se măsoară timpul de oxidare al acidului ascorbic, marcat prin apariţia culorii albastre a benzidinei oxidate.

Reactivi şi soluţii

1. Soluţie tampon acid acetic — acetat de sodiu 0,1 M, pH 4,7 ;
2. Apă oxigenată 1% (v/v), preparată în soluţia tampon 1.
3. Soluţie e acid ascorbic 1% preparată în soluţia tampon 1 (5,6 µmoli/0,1 ml probă) ;
4. Reactiv benzidină (se dizolvă 0,230 g benzidină în 3 ml acid acetic glacial, se adaugă 6,8 g CH_3 COONa. H_2O sau 4,1 g sare anhidră şi se aduce la un volum final de 250 ml cu apă distilată.
5. Preparat proteic cu activitate perozidazică * (1 g pudră acetonică de hrean este tratată cu 10 ml soluţie tampon K_2HPO_4—KH_2PO_4 0,1 M pH 7, extracţia are loc sub agitare la temperatura camerii, timp de o oră, după care omogenatul este centrifugat. Se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Mediul de reacţie conţine :

0,1 ml acid ascorbic (3) ;
1,0 ml soluţie H_2O_2 (2) ;
2,,0 ml soluţie reactiv benzidină (4) ;
1,0 ml preparat proteic (5).

Se determină timpul necesar pentru oxidarea celor 5,6 µmoli de acid ascorbic, după care soluţia de benzidină este oxidată şi devine albastră.

* Se lucrează fie cu enzimă pură, fie cu un extract proteic total obţinut prin omogenizarea a 1 g pudră acetonică de hrean cu 10 ml apă distilată şi centrifugarea omogenatului la 3 000 g/15 minute.

Calculul rezultatelor. Viteza reacției catalizată de peroxidază se exprimă în µmoli acid ascorbic oxidat/1 ml preparat enzimatic/ 1 minut/ temperatura camerii.

În cadrul rezultatelor trebuie ținut seama de diluarea preparatului enzimatic, astfel ca determinările cronometrice să fie cuprinse între 15 secunde și 1 minut.

Observații : Dacă preparatul enzimatic are o activitate peroxidazică prea mică, soluția de acid ascorbic se diluează de 10 ori (în mediu se introduc 0,56µmoli).

În acest experiment se va urmări modul în care variază viteza de reacție cu concentrația proteică a soluției de enzimă. În acest scop este urmărit timpul de oxidare a unei cantități cunoscute de acid ascorbic în cazul diluării soluției de enzimă, după cum urmează :

ml enzimă	ml apă distilată
0,1	0,9
0,2	0,8
0,4	0,6
0,6	0,4
0,8	0,2
1,0	0

celelalte componente ale amestecului fiind menținute constante, într-un volum final de 4,1 ml. Se întocmește un grafic cu rezultate experimentale obținute : trasînd pe ordonată — viteza de reacție și pe abscisă — ml preparat enzimatic / sau mai corect mg/ml proteină în mediul de reacție, determinată prin metoda Lowry.

Experiența 65. DOZAREA ACTIVITĂȚII LACTOPEROXIDAZEI

Lactoperoxidaza catalizează oxidarea peroxidului de hidrogen cu anionul iodură :

$$2\ I^- + 2\ H^+ + H_2O_2 \longrightarrow I_2 + 2\ H_2O$$

Anionul iodură reacționează cu gruparea hemică a enzimei, iar complexul format reacționează cu peroxidul de hidrogen .Prin metoda Morrison, viteza de reacție este determinată prin creșterea densității optice la 350 nm datorită formării unei triioduri. O unitate enzimatică reprezintă acea cantitate de lactoperoxidază care permite formarea unui µmol de triiodură la 25°C și la pH 7.

Reactivi și soluții.

1. Soluția tampon fosfat de sodiu 33 mM pH 7,0 ;
2. Soluția de KI 5 mM, preparată în tampon fosfat ;
3. Peroxid de hidrogen 90 mM (0,1 ml H_2O_2 30% cu 9,9 ml apă distilată) ;
4. Lapte sau preparat enzimatic pur diluat la 0,5—2,0 U/ml.

Modul de lucru. Se prepară amestecul de reacție format din 0,15 ml H_2O_2 soluție 90 mM și 29,85 ml KI soluție 5 mM, care poate fi păstrat maximum 30 minute la temperatura camerii.

Se pipetează 3 ml amestec de reacție în cuva spectrofotometrului și se lasă 5 minute pentru echilibrarea termică la 25°C.

Se adaugă 0,01 ml preparat enzimatic și se înregistrează creșterea densității optice la 350 nm timp de 3—4 minute. Spectrofotometrarea se realizează față de un martor preparat din 3 ml apă distilată și 0,01 ml preparat enzimatic.

Calculul rezultatelor. Se calculează Δ DO_{350nm} /min din partea liniară a curbei și se utilizează relația :

$$U/mg = \frac{\Delta DO_{350\,nm}/min}{26 \times mg/ml\ proteină}$$

Se determină concentrația proteică din lapte prin metoda Lowry (Experiența 52) ținînd seama de diluția probei de lapte și raportînd la numărul de mililitri din mediul de reacție se calculează activitatea specifică a lactoperoxidazei (U/mg).

6.3. DOZAREA ACTIVITĂȚII SUPEROXID DISMUTAZEI

Superoxid dismutaza catalizează reacția generală :

$$2\ O^-_2\ 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

în care are loc transformarea radicalului superoxid, generat dintr-o varietate de reacții. Enzima a fost izolată din eritrocite, țesut miocardic de bou și din *E. coli* — surse biologice în care se găsește în cantități mari. Datorită instabilității substratului ei, toate meodele de dozare ale activității superoxid dismutazei sînt indirecte. Cord și Fridovich (1969) propun o metodă în care un flux de radicali O^-_2 este generat prin acțiunea xantin oxidazei asupra xantinei, concentrația în radicali superoxid fiind determinată datorită capacității lor de a reduce citocromul c.

Observația că flavinele reduse fotochimic generează radicali superoxid, care reduce o sare de tetrazoliu, a permis punerea la punct a unor metode de detectare a activității superoxid dismutazei în soluție și pe geluri de poliacrilamidă (Experiența 48), independent de coprezența altor enzime.

In vitro radicalii superoxid apar în procesul de îmbătrînire, în peroxidarea lipidelor, în hemoliza peroxidativă a eritrocitelor, sub acțiunea radiațiilor ionizante sau în reducerea univalentă a O_2 în cursul diferitelor reacții enzimatice — protejînd celulele față de efectele nedorite ale radicalilor liberi superoxid.

Sînt caracterizate trei superoxid dismutaze cu diferiți ioni metalici : (i) Cu^{2+}—Zn^{2+} enzimă (culoare albastru-verde) din eritrocite ; (ii) Mn^{2+} enzimă (roșie) în *E. coli* și Fe^{3+}-enzimă (galbenă) din mitocondrii.

Experiența 66. DAZAREA ACTIVITĂȚII SUPEROXID DISMUTAZEI

Metoda descrisă de Winterbourn și colab. se bazează pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea sării de tetrazoliu — Nitro Blue Tetrazoliu (Nitro BT) cu radicali superoxid. O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă care produce 50% inhibiție în condiții standard. Viteza și temperatura de reacție. Radicalii superoxid sînt generați în mediul de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

Reactivi și soluții.

1. Soluție de Nitro BT (clorură de 2,2'-di(p-nitrofenil)-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenil ditetrazoliu) 1,5 mM ;
2. Soluție EDTA Na_2 0,1 M adusă la pH 7,8 cu NaOH 1 N ;
3. Soluție riboflavină 0,12 mM ;
4. Soluție tampon fosfat de potasiu 36 mM pH 7,8 ;
5. Extract proteic realizat din ficat sau din *E. coli*.

Modul de lucru. Mediul de reacție cuprinde :

2,55 ml soluție tampon ;
0,20 ml soluție EDTA Na_2 ;
0,10 ml soluție enzimă ;
0,10 ml soluție Nitro BT ;
0,05 ml soluție riboflavină.

Paralel, se realizează și un martor cu aceiași compoziție, cu excepția soluției enzimatice. Martorul și proba sînt supuși iluminării timp de 5 minute, la un bec de neon, după care se citește extincția la 560 nm.

Calculul rezultatelor.

În martor (lipsește enzima) radicalii superoxid, formați prin fotoreducerea riboflavinei, reduc sarea de tertazoliu la un formazan, intensitatea culorii albastre fiind maximă (100% inhibiție).

În probă, superoxid dismutaza descompune o parte din radicalii superoxid, iar cantitatea de formazan formată este mai mică.

Procentul de inhibiție realizat de enzima din probă se calculează utilizînd relația :

$$100 - \frac{DO_{proba}}{DO_{martor}} \times 100 = a\%\ \text{inhibiție}$$

Pentru exprimarea rezultatelor experimentale în unități enzimatice a× inhibiție se raportează la 50 și la mg/ml proteină în probă :

$$U/mg = \frac{a\%\ \text{inhibiție}}{50\%\ \text{inhibiție.mg/ml}}$$

6.4. DOZAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI

Catalaza (peroxid de hidrogen : peroxid de hidrogen oxidoreductaza, EC 1.11.1.6) este o enzimă întîlnită în toate organismele vii. A fost pentru prima dată izolată și obținută în stare cristalizată în 1937, de Sumner și Dounce, din țesutul hepatic ovin. Enzima prezintă o masă moleculară de 240 000 daltoni, patru grupări feriprotoporfirinice,

ceea ce corespunde unui conținut în Fe (II) de 0,09%. Catalaza prezintă o absorbție specifică la 405 nm (banda S o r e t), valoarea extincției fiind utilizată la determinarea concentrației catalazei. Activitatea specifică și raportul $D.O._{405\,nm}$ / $O.O._{280\,nm}$ pot constitui indici de puritate.

Activitatea catalazei variază în diferite țesuturi, cea mai mare activitate enzimatică fiind depistată în ficat și rinichi, cea mai mică — în țesutul conjunctiv. În țesuturi, catalaza este în principal legată de mitocondrii și peroxizomi, în timp ce în eritrocite enzima este „solubilă". Activitatea catalazică a sîngelui este datorată eritrocitelor.

Catalaza prezintă o funcție dublă deoarece catalizează reacțiile :

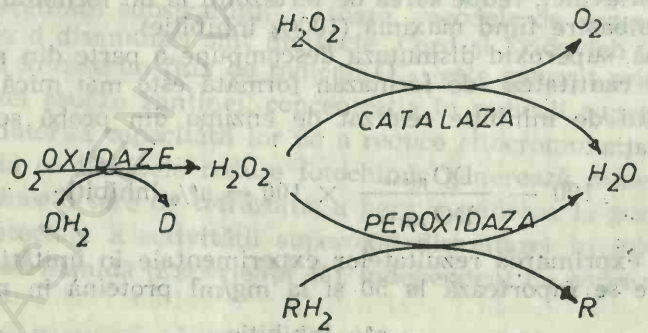
(1) $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
(2) $ROOH + DH_2 \longrightarrow ROH + D + H_2O$

— descompunerea peroxidului de hidrogen, de fapt un proces redox în care o moleculă este agent oxidant, iar cealaltă este agent reductor ;

— oxidarea unor donori de hidrogen (metanol, etanol, acid formic, fenoli).

Reacția predominantă depinde de concentrația donorului de hidrogen sau de viteza cu care sistemul enzimatic este alimentat cu H_2O_2. Inițial, se formează *complexul I :* catalază $\cdot H_2O_2$ după care prin reacția rapidă cu a doua moleculă de H_2O_2 — se formează *complexul II.* Constanta de viteză pentru reacțiile 1 este de 10^7 sec^{-1} mol^{-1}, în timp ce reacțiile peroxidazice (2) au loc mai lent : 10^2—10^3 moli/sec.

Funcția fiziologică a catalazei este încă obscură. Probabil, catalaza, localizată în *peroxizomi* joacă un rol important în metazolizarea rapidă a peroxidului de hidrogen, metabolit deosebit de toxic pentru celula vie. D e D u v e și B a u d h u i n propun următorul mecanism, în care este integrată catalaza :



unde DH_2 — acid uric, *D*-aminoacizi, *L*-aminoacizi, *L*-α-hidroacizi, acid glicolic etc. RH_2 — metanol, etanol, formiat, fenoli etc.
În peroxizomi, coexistă *enzime producătoare de* H_2O_2 : *D* și *L*-aminoacid oxidazele, urat oxidaza etc. și *enzime consumatoare de* H_2O_2 : catalaza și peroxidaza.

În eritrocite, catalaza manifestă o funcție protectoare față de hemoglobină și diferite proteine SH. La concentrații scăzute de catalază, sînt deosebit de nocivi agenții oxidanți (H_2O_2, acidul ascorbic, metil hidrazina) sau radiațiile X care conduc la formarea methemoglobinei.

Determinarea activității catalazei prezintă o deosebită importanță în analiza laptelui. În mod normal, laptele nu trebuie să manifeste o activitate catalazică. Dacă în lapte este depistată această enzimă, există indicații asupra prezenței leucocitelor, care provin de la unele maladii de secreție sau ale ugerului. Activitatea catalazică din laptele pasteurizat reprezintă și un indiciu că acest proces a fost efectuat defectuos deoarece există încă forme vegetative care conțin catalază. Cantitatea de enzimă prezentă este definită prin așa numitul *număr catalazic*, care se exprimă prin cantitatea de H_2O_2 descompusă de 100 g lapte, în decursul a două ore. Oxigenul eliberat enzimatic este determinat volumeric cu un aparat, numit *catalazerul Lobeck*.

Dozarea activității catalazei poate fi urmărită spectrofotometric în UV, prin titrare permanganometrică sau iodometrică, prin metode manometrice sau colorimetrice.

Experiența 67. METODA COLORIMETRICĂ DESCRISĂ DE SINHA

Principiul metodei. Metoda este bazată pe faptul că bicromatul de potasiu, în mediu acid, este redus de peroxidul de hidrogen la acetat cromic, care poate fi colorimetrat la 570 nm. Deoarece bicromatul nu absoarbe în această regiune, prezența compusului în mediu de reacție nu interferă cu determinarea colorimetrică a acetatului cromic. Preparatul de catalază este lăsat să acționeze asupra H_2O_2 o perioadă fixă de timp, după care reacția este stopată cu un amestec de bicromat-acid acetic glacial. Cantitatea de H_2O_2 rămasă după stoparea reacției enzimatice este determinată colorimetric.

Reactivi și soluții.

1. Reactiv bicromat-acid acetic glacial, se prepară prin amestecarea unei părți de $K_2Cr_2O_7$ soluție 5%, cu trei părți de acid acetic glacial ;
2. Soluție tampon K_2HPO_4-KH_2PO_4 0,01 M, pH 7 ;
3. Soluție H_2O_2 0,08 M, obținută prin pipetarea a 0,08 ml perhidrol (soluțit 3%) și diluarea cu soluție tampon 2, pînă la 100 ml ;
4. Soluție H_2O_2 0,16 M, preparată în soluția tampon 2 ;
5. Preparat enzimatic (1 g țesut hepatic este omogenizat cu 50 ml apă distilată ; după o oră de extracție, omogenatul se centrifughează la 10 000 t.p.m., 15 minute ; se păstrează supernatantul).

Construirea curbei etalon. Din soluția stoc 3 (80μmoli H_2O_2/ml) se fac diluții conform tabelului :

ml soluție 2	ml soluție 3	μmoli H_2O_2/ml
1,0	0	0
0,9	0,1	8
0,8	0,2	16
0,7	0,3	24
0,6	0,4	32
0,5	0,5	40
0,4	0,6	48
0,3	0,7	56
0,2	0,8	64
0,1	0,9	72
0	1,0	80

La 1 ml soluție H_2O_2 diluată conform tabelului, se adaugă 2 ml reactiv bicromat (1), probele se incubează la fierbere timp de 10 minute, se răcesc sub jet de apă și se colorimetrează la 570 nm, față de apă distilată.

Determinarea activității enzimatice. În două eprubete se pipetează concomitent :

	martor	*proba*
preparat enzimatic	0,1 ml	—
soluție tampon	0,4 ml	0,4 ml
soluție H_2O_2 0,16 M (4)	0,5 ml	0,5 ml

în probă, reacția este lăsată 15 s, 30 s, 45 s, 60 s și 120 s (deci se efectuează cinci probe stopate la intervale diferite de timp) după care se stopează cu

reactiv bicromat	2,0 ml	2,0 ml
iar în martor		
preparat enzimatic	—	0,1 ml

toate eprubetele se încălzesc pe baie de apă la fierbere, timp de 10 minute, se răcesc și se colorimetrează la 570 nm, față de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Valorile extincțiilor se transformă în µmoli H_2O_2 consumat/1 ml preparat enzimatic/temperatura camerii.

Constanta de viteză monomoleculară K pentru descompunerea H_2O_2, sub acțiunea catalazei, poate fi determinată utilizînd ecuația pentru o reacție de ordinul 1 :

$$K = \frac{I}{t} \log \frac{S_0}{S}$$

unde S_0 este concentrația inițială de H_2O_2, iar S este concentrația de peroxid după t minute. Valorile K sînt schițate față de timpul de reacție, exprimat în minute, iar constanta de viteză a catalazei K(o) la 0 minute este determinată prin extrapolare.

Conținutul în catalază a preparatului enzimatic este exprimat în termeni de *Katalasefaähigkeit* sau „Kat.f", conform formulei :

$$\text{Kat} \cdot f = \frac{K_{(0)}}{\text{g/ml proteină}}$$

care necesită și determinarea proteinelor (prin metoda Lowry sau metoda spectrofotometrică) în preparatul enzimatic.

Experiența 68. METODA SPECTROFOTOMETRICĂ DESCRISĂ DE BEERS ȘI SIZER

Principiul metodei. Mersul reacției enzimatice este urmărit spectrofotometric, la 240 nm, prin dispariția proxidului de hidrogen din mediu. O unitate enzimatică descompune un µmol de H_2O_2 într-un minut la 25°C și pH 7,0.

Reactivi și soluții.

1. soluție tampon K_2HPO_4-KH_2PO_4, 0,05 M, pH 7 ;

2. soluție H_2O_2 0,059 M, preparată în soluția tampon 1 ;

3. preparat enzimatic (preparat ca în Experiența 5.4.1) diluat corespunzător în soluția tampon 1.

Modul de lucru. Într-o cuvă de spectrofotometru se pipetează :

1,9 ml soluție tampon

1,0 ml soluție H_2O_2 0,059 M

după care se incubează 4—5 minute la 25°C pentru echilibrare termică sau pentru a stabili o viteză de descompunere a H_2O_2 neenzimatică.

Se adaugă :

0,1 ml preparat enzimatic (diluat corespunzător)

și se înregistrează scăderea densității optice la 240 nm, timp de 2—3 minute. Citirile sînt efectuate față de un martor în care s-a pipetat :

2,9 ml soluție tampon

0,1 ml preparat enzimatic.

Calculul rezultatelor. Se realizează un grafic, în care pe abscisă indicăm timpul de reacție exprimat în secunde, iar pe ordonată — densitatea optică la 240 nm. Se calculează $\Delta D.O_{240}$/minut în porțiunea lineară a curbei.

Calcularea activității enzimatice realizîndu-se după formula :

$$\text{Unități/mg} = \frac{\Delta D.O_{240}/\text{min} \times 1000}{43{,}6 \times \text{mg/ml proteină}}$$

unde 43,6 este coeficientul de extincție molară. Este necesară determinarea concentrației proteice în preparatul cu activitate enzimatică (prin metoda spectrofotometrică).

6.5. DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUCOZOXIDAZEI

Glucozoxidaza este o flavin enzimă care catalizează următoarea reacție :

$$\beta\text{-D-glucoza} + H_2O + O_2 \longrightarrow \delta\text{-D-gluconolactona} + H_2O_2$$

și este înalt specifică pentru β-D-glucoză. Anomerul α nu este transformal. Alte zaharuri ca : 2-deoxi-D-glucoza, D-manoza și D-galactoză sînt transformate de glucozoxidază cu viteze extrem de mici. Enzima izolată din *Aspergillus niger* constă din două catene polipeptidice de 80 000 daltoni fiecare, legate covalent prin punți disulfurice. Fiecare subunitate conține un mol de Fe și un mol de FAD. Macromolecula conține 74% proteină, 16% zaharuri neutre și 2% amino-zaharuri.

Glucozoxidaza este frecvent utilizată pentru îndepărtarea oxigenului din băuturi, produse alimentare umede, parfumuri, conserve ermetic închise. Cînd glucoxozidaza este utilizată ca agent antioxidant este necesară și folosirea catalazei (v. § 6.4) care protejează glucozoxidaza de efectul inactivator al H_2O_2. De asemenea, glucozoxidaza este deseori folosită pentru detectarea și estimarea glucozei în soluții industriale și în fluide corporale (sînge, urină).

Metodele folosite pentru detectarea și dozarea activității glucozoxidazei se bazează fie pe detectarea consumului de oxigen, fie pe determinarea cantității de H_2O_2 eliberată în reacție.

Cel mai mult folosite sînt metodele bazate pe estimarea concentrației H_2O_2 din reacție. Numeroase metode folosesc determinarea H_2O_2 prin intermediul catalazei și peroxidazei în prezența unor agenți cromogeni (*o*-dianizidina, *o*-toluidina, *o*-fenilendiamina, guaiacolul 2,2'-azino-di-(3-etil-benz-tiazolin-6-sulfonat) — prescurtat ABTE etc.) care permit detectarea fotometrică a reacției.

Experiența 69. DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUCOZOXIDAZEI PRIN METODA BANTON MODIFICATĂ DE NOI

Principiul metodei. Sistemul enzimatic al glucozoxidazei este cuplat cu un al doilea sistem peroxidază — *o*-dianizidină.

$$\beta\text{-D-glucoză} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{glucozoxidază}} \text{acid gluconic} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{o-dianizidină redusă} \xrightarrow{\text{peroxidază}} \text{o-dianizidină oxidată}$$

H_2O_2 rezultat din prima reacție, va forma cu peroxidaza un complex cu puternic caracter oxidant, care va oxida *o*-dianizidina. In mediu puternic acid, o-dianizidina oxidată prezintă o colorație specifică roșu-volet.

Reactivi și soluții

1. Soluție standard de glucoză 300 mg/ml (se prepară proaspăt, datorită fenomenului de mutarotație) ;
2. Tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1 M, pH 5,5 ;
3. Soluție o-dianizidină — forma redusă — 0,66 mg/ml preparată în alcool etilic absolut ;
4. Soluție peroxidază 0,66 mg/ml, preparată în soluția tampon 2 ;
5. Preparat proteic cu activitate glucozoxdiazică (1 g miceliu de *Aspergillus niger* este mojarat cu nisip de cuarț în prezența a 10 ml apă distilată, extracție 24 h la 4°C, centrifugare la 10 000 r.p.m. 15 minute, se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Amestecul de reacție conține :

0,15 ml peroxidază (4) ;

0,15 ml o-dianizidină (3) ;

0,1 ml glucoză (1) ;

0,8 ml soluție tampon (2) ;

0,3 ml preparat proteic cu activitate glucoxidazică și este incubat timp de 5 minute la 37°C. Reacția enzimatică este stopată cu 2 ml H_2SO_4 10 N.

Pentru fiecare probă se efectuează un martor, în care se introduc aceleași componente, dar agentul de stopare se introduce înaintea soluției de glucozoxidază.

După răcirea probelor la temperatura camerii, probele se colorimetrează la 525 nm față de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Activitatea glucozoxidazică a preparatului proteic se exprimă în :

ΔD.O. ($D.O._{525\,nm}$ probă — $D.O._{525\,nm}$ martor) ml/min/37°C sau, dacă dozăm concentrația proteică în preparatul cu activitate enzimatică 5 — sub forma *activității specifice :*

ΔD.O./mg proteină/min/37°C.

Observații : În cadrul aceleiași experiențe se va determina K_M glucozoxidazei din *A. niger*. Se lucrează exact în condițiile descrise mai sus, folosind ca substrat glucoza în concentrații variabile de la 30 mg/ml (102 µM) la 300 mg/ml (1020 µM) în tampon acetat 0,1 M, pH 5,5 în cadrul aceluiași volum de soluție, conform tabelului de mai jos. Pentru fiecare concentrație de glucoză se efectuează o probă și un martor. Rezultatele experimentale obținute vor fi prezentate într-un tabel de tipul următor :

glucoză					$D.O._{525}$		D.O/ml min 37°C(v)	$\frac{1}{v}$
ml sol. 1	ml sol. 2	mg/ml	µM(S)	$\frac{1}{S}$	P	M		
0,1	0,8	30	102	9,80				
0,2	0,7	60	204	4,90				
0,3	0,6	90	306	3,20				
0,9	0	270	918	1,10				

Pentru calcularea K_M se va folosi prelucrarea matematică Lineweaver și Burk. (Figura 6.1.).

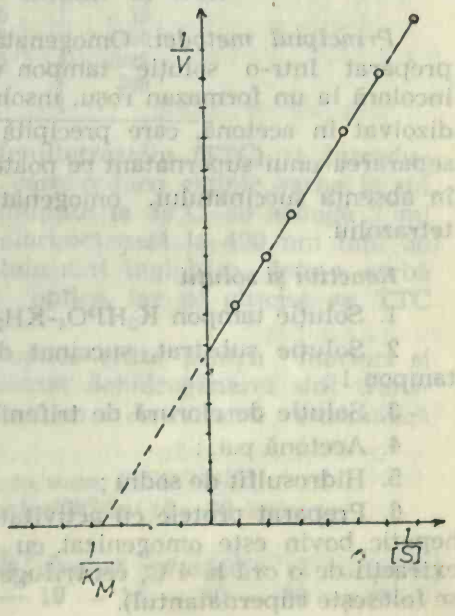
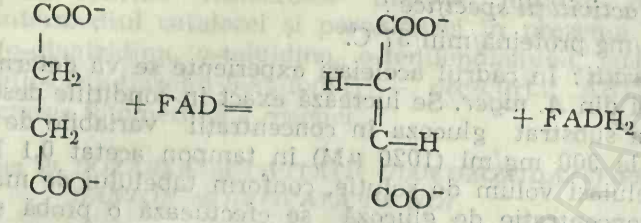


Fig. 6.1. Variația vitezei unei reacții enzimatice cu concentrația substratului.

6.6. DOZAREA ACTIVITĂȚII SUCCINAT DEHIDROGENAZEI

Succinat : Acceptor de hidrogen oxidoreductaza catalizează o reacție reversibilă FAD-dependentă :



$$FADH_2 + A = FAD + AH_2$$

ce face legătura între ciclul Krebs și cel de-al doilea situs de fosforilare de la nivelul catenei respiratorii. Acceptorul de echivalenți de reducere, din celulă, este necunoscut. *In vitro* pot fi folosiți ca acceptori de hidrogen : albastru de metilen, tionina, albastru de indofenol și cel mai eficient — fenazin metosulfatul.

Enzima este larg distribuită la plante, animale și microorganisme. Succinat dehidrogenaza izolată din țesut cardiac bovin are o masă moleculară de 200 000 și oxidează succinatul, L-metilsuccinatul, L-etilsuccinatul, L-clorosuccinat, precum și D- și L-malatul dar nu transformă derivații dialchil ai succinatului sau derivații monoalchil cu catenă lungă.

Experiența 70. DETERMINAREA COLORIMETRICĂ A SUCCINAT DEHIDROGENAZEI CU CLORURĂ DE TRIFENILTETRAZOLIU, DUPĂ KUN ȘI ABOOD

Principiul metodei. Omogenatele tisulare, în prezența succinatului preparat într-o soluție tampon de pH 7,4, reduc sarea de tetrazoliu incoloră la un formazan roșu, insolubil în apă. Formazanul poate fi ușor dizolvat în acetonă, care precipită proteinele tisulare, permițînd astfel separarea unui supernatant ce poate fi colorimetrat. În condițiile acestea, în absența succinatului, omogenatele tisulare nu pot reduce sarea de tetrazoliu.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon K_2HPO_4-KH_2PO_4 0,1 M, pH 7,4 ;
2. Soluție substrat, succinat de sodiu 0,2 M, preparată în soluția tampon 1 ;
3. Soluție de clorură de trifeniltetrazoliu 0,1% ;
4. Acetonă p.a. ;
5. Hidrosulfit de sodiu ;
6. Preparat proteic cu activitate succinat dehidrogenazică (1 g țesut hepatic bovin este omogenizat cu 10 ml soluție tampon 1, supus unei extracții de o oră la 4°C, centrifugat la 10.000 r.p.m. timp de 15 minute ; se folosește supernatantul).

Modul de lucru. În tuburi de centrifugă (de 15—20 ml) se pipetează :
0,5 ml soluție tampon (1) ;
0,5 ml soluție substrat (2) ;
1,0 ml preparat proteic (6) ;
1,0 soluție a sării de tetrazoliu (3) proaspăt preparată, iar apoi se incubează la 38°C, timp de 15—30 minute. Pentru stoparea reacției enzimatice, în fiecare tub se adaugă 7 ml acetonă. Proteinele precipitate de acetonă sînt îndepărtate prin centrifugare la 7 000 t.p.m., 10 minute, iar supernatantul este colorimetrat la 420 nm.

Pentru fiecare probă se efectuează un martor în care cei 7 ml de acetonă sînt adăugați imediat după preparatul proteic :

0,5 ml soluție tampon (1) ;
0,5 ml soluție substrat (2) ;
1,0 ml preparat proteic (6) ;
7,0 ml acetonă ;
1,0 ml soluție a sării de tetrazoliu (3)

iar acest amestec este incubat la 38°C, timp de 15—30 minute. După centrifugare, supernatantul este colorimetrat la aceeași lungime de undă.

Construirea curbei etalon. Dintr-o soluție stoc de clorură de trifeniltetrazoliu 15 mg% se fac diluții conform tabelului :

stoc ml soluție	ml apă	μg TTC
0,1	1,9	15
0,2	1,8	30
0,3	1,7	45
0,5	1,5	75
1,0	1,0	150
1,5	0,5	225
2,0	0	300

În fiecare eprubetă cu clorură de trifeniltetrazoliu (TTC) se introduc cîteva cristale de hidrosulfit de sodiu, care reduce chimic sarea la un formazan. Eprubetele sînt incubate 15 minute la 38°C, se adaugă 7 ml acetonă care extrage formazanul. Se colorimetrează la 420 nm față de apă distilată și rezultatele experimentale sînt înglobate într-o curbă etalon trasînd pe ordonată densitățile optice, iar pe abscisă μg TTC redus în probă.

Calculul rezultatelor. Densitățile optice citite pentru martori și probe din cadrul testării activității succinat dehidrogenazei sînt transformate în μg TTC cu ajutorul curbei etalon. Activitatea enzimatică poate fi calculată astfel :

$$\mu g\ TTC_{din\ proba} - \mu g\ TTC_{din\ martor}$$ reprezintă

μg TTC redus de 1 ml preparat enzimatic/38°/în 15—30 minute.

Observații

În cadrul aceleiași experiențe se va efectua un studiu al variației vitezei de reacție în decursul a 0 — 5 — 10 — 15 — 20 — 30 — 40 — 60 minute, la 38°C.

6.7. DOZAREA L-AMINOACID OXIDAZEI

Această enzimă care catalizează reacția generală :

$$\text{L-aminoacid} + H_2O + O_2 \longrightarrow \text{2-cetoacid} + NH_3 + H_2O_2$$

a fost izolată din veninul de șarpe, are un domeniu optim de pH la 7,0—7,5, este o glicoproteidă și conține 2 moli FAD/mol apoenzimă. L-aminoacid oxidaza este specifică pentru izomerii L ai leucinei, metioninei, fenilaninei, norvalinei, norleucinei, cisteinei, tirozinei, triptofanului și citrulinei. Histidina, arginina și ornitina sînt oxidați lent, iar glicina nu constituie un substrat enzimatic. De asemenea, nu constituie substrate ale L-aminoacid oxidazei aminoacizii cu gruparea α-carboxil sau α-amino substituite, L-aminoacizi cu o grupare amino secundară și D-aminoacizii.

L-aminoacid oxidaza a fost mult studiată în vederea elucidării flavin catalizei și pentru determinarea specifică a L-aminoacizilor din amestecuri.

Experiența 71. DOZAREA ACTIVITĂȚII L-AMINOACID OXIDAZEI PRIN METODA MESSEY ȘI CURTI

Principiul metodei. L-leucina este oxidată la cetoizocapronat și peroxid de hidrogen sub acțiunea L-aminoacid oxidazei, iar H_2O_2 este dozat în prezența peroxidazei și o-dianizidinei (DH_2) :

$$\text{L-leucina} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{L-aminoacid oxidază}} \text{cetoizocapronat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{peroxidază}} 2\,H_2O + D$$

Modificarea densității optice la 436 nm per unitatea de timp este o măsură a activității L-aminoacid oxidazei.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Tris/HCl 0,2 M, pH 7,6 ;
2. Soluție o-dianizidină (13 mg o-dianizidină. HCl/2 ml) ;
3. Soluție substrat leucină 7,6 mM (50 mg L-leucină/50 ml soluție tampon 1 + 0,5 ml soluție 2) ;
4. Soluție peroxidază (10 mg/ml) ;
5. Soluție enzimă (1 mg/ml diluată imediat înaintea folosirii 1 + 99 cu apă distilată).

Modul de lucru. Se pipetează amestecul de reacție într-o cuvă de cuarț :

3,00 ml soluție 3 ;
0,01 ml soluție peroxidază (4) ;
0,02 ml soluție enzimă.

Este citită densitatea optică la 436 nm — 1, 2, 3, 4, 5 minute de reacție față de un martor :

3,00 ml soluție (3) ;

0,01 ml soluție peroxidază ;
0,02 ml soluție tampon (1).

Calculul rezultatelor. Se calculează media valorilor ΔD.O./min care se introduce în formula :

$$U/ml\ probă = \frac{3,03}{8,1 \times 1,0 \times 0,02} \Delta D.O./min$$

6.8. DOZAREA MALAT DEHIDROGENAZEI

Malat dehidrogenaza este o enzimă implicată în ciclul K r e b s care catalizează reacția reversibilă :

$$L\text{-malat} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{oxaloacetat} + NADH + H^+$$

Enzima izolată din țesut cardiac suin are o structură oligomeră formată din două subunități de aproximativ 35 000 daltoni, 14 grupări SH per moleculă și leagă doi moli de coenzimă. Are un pH izoelectric de 6,1—6,4 și un pH optim de acțiune (în sensul NADH — NAD) de 7,4.

Procariotele conțin o singură enzimă. Toate eucariotele prezintă două izoenzime : mitocondrială (m-MDH) și citoplasmatică (s-MDH). Cele două izoenzime diferă prin proprietățile lor fizice și cinetice, pH optim și afinitatea pentru substrat. De asemenea, s-a evidențiat și o distribuție diferită a celor două izoenzime în diverse organe.

Malat dehidrogenaza reprezintă o *enzimă indicator* pentru determinarea activității transaminazei glutamice (GOT), a ATP-citrat liazei și citrat sintazei. Ea este, de asemenea, folosită în determinarea malatului și oxaloacetatului. Activitatea MDH în ser și în fluidul cerebrospinal are și o semnificație clinică, fiind un test de sănătate.

Experiența 72. DOZAREA ACTIVITĂȚII MALAT DEHIDROGENAZEI DIN EXTRACTE TISULARE

Principiul metodei. Viteza de reacție este determinată prin măsurarea scăderii densității optice la 340 nm, ca rezultat al oxidării NADH. O unitate de activitate enzimatică va cataliza oxidarea unui μmol NADH într-un minut, la pH 7,4 și în condiții specifice.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon KH_2PO_4—K_2HPO_4 0,1 M, pH 7,5 ;
2. Soluție oxaloacetat, 2 mg acid oxaloacetic/ml soluție 1 ;
3. Soluție NADH, 10 mg/ml ;
4. Preparat enzimatic (1 g țesut cardiac de porc este triturat cu 10 ml soluție tampon 1, după o oră extracție se centrifughează la 10 000 t.p.m., se păstrează supernatantul) diluat corespunzător.

Modul de lucru. Într-o cuvă de cuarț se pipetează următorul amestec de reacție :

2,83 ml soluție tampon 1 ;

0,10 ml soluție oxaloacetat 2 ;
0,05 ml soluție NADH ;

se amestecă, iar reacția este inițiată prin adiția de

0,02 ml preparat enzimatic.

Este citită densitatea optică la 340 nm — după 1, 2, 3, 4, 5 minute reacție față de un martor :

2,88 ml soluție tampon 1 ;
0,1 ml soluție oxaloacetat 2 ;
0,02 ml preparat enzimatic.

Calculul rezultatelor. Se calculează media pentru valorile $\Delta D.O._{340}$ /minut, care se introduce în formula :

$$U/ml\ probă = \frac{3,00}{6,22 \times 1,0 \times 0,02} \Delta D.O._{340\ nm}\ minut$$

unde 6,22 este coeficientul de extincție molară al NAD^+ la 340 nm.

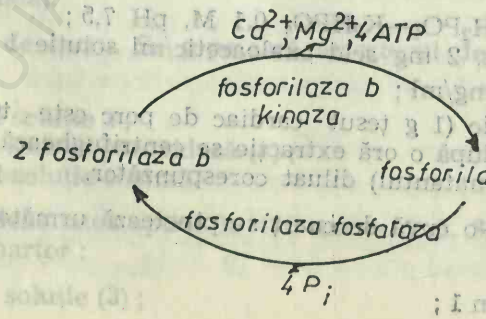
6.9. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFORILAZEI *a* ȘI *b*

Fosforilaza catalizează reacția :

$$(\alpha\text{-}1,4\text{-glucozil})_n + P_i \underset{\text{fosforilaza } b + AMP}{\overset{\text{fosforilaza } a}{\rightleftharpoons}} (\alpha\text{-}1,4\text{-glucozil})_{n-1} + \alpha\text{-D-glucozo-1-P}$$

în care forforilaza *b* prezintă necesități absolute pentru adenozin-5'-monofosfat, în timp ce fosforilaza *a* este activă și în absența acestui efector.

Enzima izolată din mușchiul iepurelui există în două forme : fosforilaza *a* un tetramer (370 000 daltoni) și fosforilaza *b* un dimer (185 000 daltoni) ai unui monomer de 92 500 daltoni. Fosforilaza *b* este transformată sub acțiunea fosforilazei *b* kinaze, ATP și Mg^{2+} în fosforilază *a* ; reacția inversă fiind catalizată de fosforilaza fosfatazei :



Monomerul enzimei conține un mol de piridoxal-5'-fosfat ca grupare prostetică, un rest de serină fosforilat în cazul fosforilazei *a* și nefosforilat în cazul fosforilazei *b*, precum și 9—11 grupări SH.

Enzimele sînt activate de EDTA, mercaptoetanol sau ditiotreitol, glicogen și AMP și sînt inactivate de metale grele, reactiv de blocare a grupărilor SH și glucoză.

Experiența 72. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFORILAZEI PRIN METODA LUI CORI ȘI ILLINGWORTH

Principiul metodei. Activitatea fosforilazei este măsurată în direcția sintezei prin determinarea cantității de fosfat anorganic (P_i) format din glucozo-1-fosfat în condițiile în care reacția urmează o cinetică de ordinul 1. În soluții proteice nepurificate, reacția este realizată la pH 6,0 pentru a minimaliza metabolizarea glucozo-1-fosfatului sub acțiunea fosfoglucomutazei. În soluții de enzimă pură, reacția este realizată la pH 6,8.

Reactivi și soluții

1. Soluție glicogen 4%;
2. Soluție tampon Tris-HCl, 5×10^{-2}M, pH 6,8;
3. Soluție glucozo-1-fosfat (sare dipotasică) 0,032 M (0,595 g dizolvate în soluție tampon 2 pînă la un volum final de 50 ml);
4. Soluție 5'-acid adenilic 0,02 M (0,35 g dizolvate în soluție tampon 2 pînă la un volum final de 50 ml);
5. Soluție acid sulfuric diluat (10 ml H_2SO_4 5 N + 690 ml apă distilată);
6. Reactivi pentru dozarea ortofosfatului eliberat, prin metoda Fiske-Subbarow.
7. Extract proteic total (1 g țesut muscular striat de la *Carassius carassius este* triturat în prezența a 10 ml apă distilată, extracția este condusă la 4°C timp de o oră, după care omogenatul este centrifugat la 10.000 r.p.m., timp de 5 minute. Se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Amestecul de reacție constînd din :

0,4 ml extract proteic (7)
0,2 ml soluție glicogen (8 μg)

se preincubează 20 minute la 37°C, după care se adaugă :

0,4 ml soluție glucozo-1-fosfat 12,7 μmoli);
0,4 ml soluție 5'-AMP (8,06 μuoli);
0,2 ml soluție tampon (2).

Se stopează reacția după 0, 5, 10, 15 minute — cînd se iau probe de cîte 0,2 ml și se pipetează în eprubete cu cîte 7 ml soluție diluată de H_2SO_4 (5).

Proteinele precipitate sînt îndepărtate prin filtrare.
Pentru reacția de culoare, se amestecă

4,0 ml filtrat
0,8 ml soluție molivdat de amoniu
0,2 ml soluție eiconogen

probele sînt incubate la 37°C timp de 5 minute, după care sînt colorimetrate la 660 nm.

Densitățile optice citite pentru probele stopate după 0, 5, 10, 15 minute de reacție enzimatică sînt transformate în µmoli ortofosfat cu autorul unei curbe etalon (v.mai departe).

Calculul rezultatelor. (μmoli ortofosfat$_{timp-t}$ — μmoli ortofosfat$_{timp-0}$) $\cdot \frac{7,2}{4} \cdot \frac{1,6}{0,2} \cdot \frac{1}{0,4}$ = μmoli eliberați/1 ml enzimă /37°/ t minute ; fracția $\frac{7,2}{4}$ reprezintă un factor de transformare pentru determinarea cantității de ortofosfat din 7,2 ml ; fracția $\frac{1,6}{0,2}$ transformă cantitatea de ortofosfat din 0,2 ml amestec de reacție la întregul volum al amestecului (1,6 ml) ; $\frac{1}{0,4}$ este un factor al activității catalitice pentru 1 ml preparat proteic.

Experiența 73. DOZAREA FOSFORULUI PRIN METODA FISKE-SUBBAROW

Principiul metodei. Ortofosfatul este dozat colorimetric în urma reacției cu molibdatul de amoniu în mediu acid :

$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MoO_4 + 21\ HNO_3 = (NH_4)_3H_4[P(Mo_2O_7)_6] + 21\ NH_4NO_3 + 10\ H_2O$$

Fosfomolibdatul de amoniu este redus, în mediu slab acid, la „albastru de molibden" care este dozat colorimetric. Agentul reducător este acidul 1-amino-2-naftol-4-sulfonic.

Soluții și reactivi

1. Soluție standard de fosfor (0,439 g K_2HPO_4 se dizolvă la 1000 ml apă distilată ; soluția obținută se diluează de cinci ori (1:4) cînd se obține o concentrație finală de 20 µg P_i/ml) ;
2. Soluție de molibdat de amoniu (2,5% preparată în H_2SO_4 5 N) ;
3. Soluție reducătoare de eiconogen (se dizolvă în ordinea indicată 6 g metabisulfit de sodiu, 0,2 g sulfit de sodiu și 0,1 g acid 1-amino-2-naftol-4-sulfonic și se aduce la 80 ml volum final).

Construirea curbei etalon. Din soluția standard de fosfor 20 µg P_i/ml se fac diluții după cum urmează :

ml soluție standard	ml apă dist.	µ Pi
0,00	4,00	0
0,25	3,75	5
0,50	3,50	10
0,75	3,25	15
1,00	3,00	20
1,25	2,75	25

În fiecare din cele 6 eprubete se pipetează cîte :
0,8 ml soluție molibdat (2) ;
0,2 ml soluție reducătoare (3).

După o incubare la 37°C timp de 5 minute, soluțiile sînt colorimetrate la 660 nm față de apă distilată.

Se construiește o curbă etalon, trasînd pe abscisă μg P_i în probă, iar pe ordonată $D.O._{660\ nm}$

6.10. DOZAREA ACTIVITȚII GLUTAMAT OXALOACETAT TRANSAMINNZEI (GOT)

Enzima glutamat oxaloacetat transminaza (prescurtat (GOT) are denumirea științifică L-aspartat : 2-oxoglutarat aminotransferaza și catalizează reacția :

aspartat + 2-oxoglutarat $\rightleftharpoons$ glutamat + oxaloacetat

și se găsește în microorganisme, plante și toate țesuturile animale și vegetale. Este deosebit de activă în mușchiul cardiac, după care urmează în creier, ficat, mucoasa gastrică, țesut adipos, mușchi striați, rinichi și în cantități mai mici în serul sangvin.

GOT necesită piridoxal-5-fosfat ca grupare prostetică, care se leagă printr-un sistem de baze Schiff la grupare ε-amino a unui rest lizil din macromolecula proteică a apoenzimei.

Există multe tipuri de metode de determinare a activității GOT :

— cromatografia pe hîrtie a substanțelor și produșilor de reacție ;

— determinarea spectrofotometrică a oxalacetatului la 280 nm ;

— determinarea manometrică a glutamatului format cu ajutorul enzimei glutamat decarboxilaza ;

— determinarea spectrofotometrică cu enzimă indicator — MDH, în prezența NADH ;

— determinarea colorimetrică a cetoacidului format cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, în mediu alcalin.

Experiența 74. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GOT PRIN METODA LUI REITMAN ȘI FRANKEL

Principiul metodei. Produsul reacției enzimatice — oxalacetatul este determinat colorimetric cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, în mediu alcalin. De fapt, amestecul de reacție conține trei cetoacizi : oxaloacetat, piruvat (format din decarboxilarea spontană a oxaloacetatului) și 2-oxoglutarat — toți formînd hidrazone cu maxime de absorbție la lungimi de undă diferite (Figura 6.2). În cursul reacției concentrațiile în

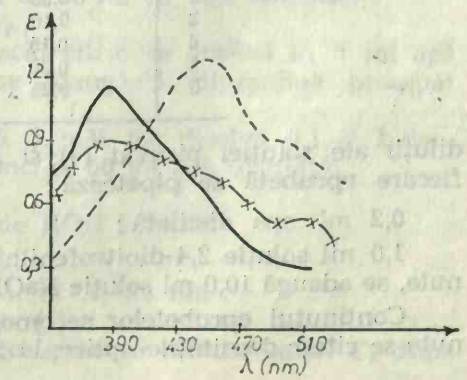


Fig. 6.2. Spectrele de absorbție ale hidrazonelor acidului pirnic (----), acidului oxalacetic (x-x-x-) și acidului 2-oxoglutaric (—).

oxaloacetat și piruvat cresc, iar cantitatea de 2-oxoglutarat scade. Se recomandă ca citirile la fotoelectrocolorimetru să fie conduse la 500—550 nm, lungime de undă mai mare decît cea corespunzătoare maximelor de absorbție — la care contribuția la culoare a hidrazonelor piruvatului și oxaloacetatului predomină.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon substrat (se dizolvă 1,5 g K_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4, 30 mg acid 2-oxoglutaric și 1,57 g L-aspartat de Na sau 1,32 g acid L-aspartic în 70 ml apă distilată, se ajustează pH la valoarea de pH 7,4 și se diluează la 100 ml cu apă distilată);
2. Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (20 mg la 100 ml HCl 1 N);
3. Soluție NaOH 0,4 N;
4. Soluție piruvat 2 mM (se dizolvă 22 mg piruvat de sodiu și se aduce la 100 ml cu apă distilată);
5. Ser sanguin uman proaspăt recoltat.

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din:

1,0 ml soluție tampon substrat (1);
0,2 ml ser;

și este incubat timp de 60 minute pe o baie de apă termostatată la 37°C, după care reacția enzimatică este stopată prin adiția de:

1,0 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (2).

Probele sînt bine omogenizate, și lăsate la temperatura camerii timp de 20 minute, pentru definitivarea reacției de formare a hidrazonelor. Pentru dezvoltarea culorii, se adaugă 10,0 ml soluție NaOH 0,4 N se agită viguros și după 5 minute, se citește densitatea optică la 546 nm față de un martor, care se prepară similar, numai că în loc de 0,2 ml ser — în amestecul de reacție se introduc 0,2 ml apă.

Construirea curbei etalon. În 6 eprubete se pipetează succesiv:

No.	ml soluție 4	ml soluție 1
1	0,00	1,00
2	0,05	0,95
3	0,10	0,90
4	0,15	0,85
5	0,20	0,80
6	0,25	0,75

diluții ale soluției piruvat (4) și ale soluției tampon substrat (1). În fiecare eprubetă se pipetează:

0,2 ml apă distilată;

1,0 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină; se amestecă și după 20 minute, se adaugă 10,0 ml soluție NaOH 0,4 N.

Conținutul eprubetelor se omogenizează prin agitare și după 5 minute se citesc densitățile optice, la 546 nm, a eprubetelor 2—6, față de 1.

Se construiește o curbă etalon cu densitățile optice pe ordonată și U/l pe abscisă. Prin comparare cu metoda spectrofotometrică cu enzimă indicator (H. U. Bergmeyer) se obțin relațiile :

eprubeta	2	corespunde 10,5 U/l ser
	3	21,0
	4	32,0
	5	48,0
	6	70,0

Calculul rezultatelor. Densitățile optice citite la determinarea activității GOT în serul uman proaspăt sînt transformate în U/l ser cu ajutorul curbei etalon.

Valori normale

Există relații bine stabilite între activitățile transminazice și datele antropometrice privind sexul, vîrsta și greutate corporală a omului. Valorile medii normale sînt :

bărbat — 11,1 U GOT/l ser ;
femeie — 9,2 U GOT/l ser ;

Experiența 75. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GOT PRIN METODA LUI TONHAZY ȘI WHITE

Principiul metodei. Oxaloacetatul format din reacție este cantitativ transformat în piruvat cu ajutorul citratului de anilină. Hidrazona piruvatului este selectiv extrasă în toluen, iar inensitatea culorii acesteia în mediu alcalin poate fi determinată la 540 nm.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon substrat (se dizolvă 0,87 g K_2HPO_4 și 0,66 g acid L-aspartic în 25 ml apă distilată se aduce pH la 7,4 cu ajutorul unei soluții de KOH 0,5 N și se completează volumul soluției pînă la 50 ml) ;
2. Soluție de 2-oxoglutarat 0,1 M (se dizolvă 0,146 g acid 2-oxoglutaric într-un volum minim de apă distilată, se aduce pH la 7,4 și apoi se completează la un volum final de 10 ml cu apă distilată) ;
3. Acid tricloracetic, soluție 100% ;
4. Soluție citrat de anilină (5 g acid citric se dizolvă în 5 ml apă distilată ; imediat înaintea folosirii se adaugă 5 ml anilină proaspăt distilată) ;
5. Soluție 2,4-dinitrofinilhidrazină 5 mM (se dizolvă 0,1 g hidrazină într-un amestec de 20 ml HCl conc. și 50 ml apă distilată) ;
6. Toluen, saturat cu apă ;
7. Soluție alcoolică (95% etanol) de KOH 0,45 M ;
8. Ser sanguin uman proaspăt.

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din :

0,50 ml soluție tampon substrat (1) ;

0,20 ml ser sanguin care este preincubat 5 minute la 37°C, după care se adaugă :

0,20 ml soluție 2-oxoglutarat (2).

Reacția enzimatică este condusă la 37°C, timp de 10 minute, după care este stopată cu 0,10 ml soluție acid tricloracetic (3). După agitarea probelor, în vederea precipitării proteinelor. se adaugă 0,20 ml soluție citrat de anilină (4) care decarboxilează oxaloacetatul format la piruvat — reacție care poate fi considerată a fi totală după 10 minute de staționare la temperatura camerii. Se adaugă apoi 1,00 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (5), se incubează 5 minute la 37°C, după care hidrazona piruvatului este extrasă selectiv cu 2,00 ml toluen saturat cu apă După agitare puternică, staționare 5 minute, probele sînt centrifugate 5 minute la 3 000 r.p.m., la 1 ml supernatant adăugîndu-se 5 ml soluție alcoolică de KOH. Se omogenizează conținutul eprubetelor, se lasă să stea 5 minute, se adaugă 1,0 ml apă distilată, obținîndu-se un volum final de 7,0 ml.

Probele sînt colorimetrate la 540 nm față de un martor realizat similar, numai că serul este adăugat după acidul tricloracetic.

Calculul rezultatelor. Se vor compara rezultatele cu acelea ale unui ser control de activitate cunoscută. Se va construi, de asemenea, o curbă standard cu U ser control/l — pe abscisă și densități optice pe ordonată.

Precizia metodei lui T o n h a z y este superioară celei caracteristice metodei R e i t m a n-F r a n k e l.

6.11. DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUTAMAT PIRUVAT TRANSAMINAZEI (GPT)

Enzima glutamat piruvat transaminaza (prescurtat GPT) are denumirea științifică L-alanin : 2-oxoglutarat aminotransferaza și catalizează reacția :

$$\text{alanina} + \text{2-oxoglutarat} \rightleftharpoons \text{piruvat} + \text{glutamat}$$

și se găsește alături de GOT în toate țesuturile procariotelor și eucariotelor. Aceste enzime au o deosebită importanță în organism făcînd legătura dintre metabolismul glucidelor, lipidelor (prin intermediul cetoacizilor) și metabolismil proteic (prin intermediul aminoacizilor).

Experiența 76. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GPT PRIN METODA REITMAN ȘI FRANKEL

Principiul metodei. Unul din produșii reacției enzimatice, piruvatul este dozat colorimetric în urma reacției lui cu 2,4-dinitrofenilhidrazina în mediu alcalin. Și substratul cetoacid, 2-oxoglutaratul formează, în aceleași condiții, o hidrazonă care însă prezintă o absorbție maximă la altă lungime de undă. Colorimetrarea se realizează la 500—550 nm pentru o menține scăzută contribuția hidrazonei 2-oxoglutaratului la valoarea densității optice. Metoda este standardizată prin compararea directă cu dozarea GPT în prezența de enzimă indicator — lactat dehidrogenaza și cu standarde conținînd diferite cantități de piruvat, dar cu o cantitate moleculară constantă de piruvat + 2-oxoglutarat.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon substrat (se dizolvă 1,5 g K_2HPO_4, 0,2 g KH_2PO_4, 30 mg acid 2-oxoglutaric și 1,78 g DL-alanină, se ajustează pH la 7,4 și se aduce la un volum final de 100 ml) ;

2. Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM (se dizolvă 20 mg în 100 ml HCl 1 N) ;

3. Soluție NaOH 0,4 N ;

4. Soluție piruvat 2 mM (se dizolvă 22 mg piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată).

.5 Ser sanguin uman proaspăt.

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din : 1,0 ml soluție tampon substrat (1) ; 0,2 ml ser și este incubat timp de 30 minute pe o baie termostatată la 37°C, după care reacția enzimatică este stopată prin adiția de 1,0 ml soluție 2,4-dintirofenilhidrazină (2). Probele sînt bine omogenizate și lăsate la temperatura camerii timp de 20 minute, pentru definitivarea reacției de formare a hidrazonelor. Pentru dezvoltarea culorii se adaugă 10,0 ml soluție NaOH 0,4 N, se amestecă și după 5 minute, se citește densitatea optică la 546 nm față de un martor, care se prepară similar, dar cu apă distilată în loc de ser.

Construirea curbei etalon. În 6 eprubete se pipetează diluții din soluția de piruvat (4) și din soluția tampon substrat (1) după cum urmează :

No.	ml soluție 4	ml soluție 1
1	0,0	1,0
2	0,1	0,9
3	0,2	0,8
4	0,3	0,7
5	0,4	0,6
6	0,5	0,5

în fiecare eprubetă se pipetează 0,2 ml apă distilată, 1,0 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (2), se amestecă și după 20 minute staționare la temperatura camerii, se adaugă 10,0 ml soluție NaOH 0,4 N (3).

Conținutul eprubetelor se omogenizează prin agitare și după 5 minute se citesc densitățile optice, la 546 nm, eprubetele 2—6 față de 1.

Se construiește o curbă etalon cu densitățile optice pe ordonată și U GPT/litru ser pe abscisă. Prin comparare cu metoda spectrofotometrică cu enzimă indicator (H. U. Bergmeyer) se obțin relațiile :

eprubeta	2	corespunde 13 U/l ser
	3	28
	4	48
	5	78
	6	102

Calculul rezultatelor. Densitățile optice citite la determinarea activității GPT în serul uman proaspăt sînt transformate în U/l ser cu ajutorul curbei etalon.

Valori normale. Limitele superioare ale valorilor normale măsurate pentru activitatea GPT sînt mai mari la bărbat decît la femeie. Pentru ambele sexe există o strînsă corelație între activitatea enzimei și greutatea corporală.

femeie — 9,05 U GPT/l ser
bărbat — 12,2 U GPT/l ser.

Experiența 77. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GPT DIN EXTRACTE TISULARE PRINTR-O METODĂ ADAPTATĂ DE NOI

Principiul metodei. Piruvatul eliberat în urma reacției enzimatice este dozat colorimetric în mediul acalin cu 2,4-dinitrofenilhidrazină.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon fosfați de potasiu, 5×10^{-3} M, pH 7,5 ;
2. Soluție A (12 ml soluție tampon 1 ; 2,5 ml soluție L-alanină 0,5 M preparată în tampon ; 1,5 ml soluție acid 2-oxoglutaric 0,1 M preparat în tampon — toate componentele aduse la pH 7,5) ;
3. Soluție B (14,5 ml soluție tampon ; 1,5 ml soluție acid 2-oxoglutaric 0,1 M, preparată în tampon — amestecul adus la pH 7,5) ;
4. Soluție de acid tricloracetic 50% ;
5. Soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,1% preparată în HCl 2N ;
6. Toluen p.a. ;
7. Soluție de KOH 4% în etanol 96% ;
8. Soluție de piruvat de sodiu 0,01 M ;
9. Preparat proteic cu activitate GPT (1 g țesut hepatic de șobolan triturat cu 20 ml soluție tampon 1, o oră extracție, centrifugare 15 minute la 10 000 r.p.m. ; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Pentru determinarea activității enzimatice se iau probe paralele care conțin cîte 0,5 ml soluție *A*, respectiv 0,5 ml soluție B și 0,1 ml preparat proteic. După 30 minute de incubare la 37°C, reacția este stopată prin adăugarea în probe a cîte 0,1 ml acid tricloracetic, soluție 50%.

În fiecare probă se adaugă cîte 1 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină (5), urmînd o incubare la 60°C timp de 30 minute.

După răcire se adaugă cîte 2 ml toluen și se agită puternic pentru o mai bună extracție a hidrazonei formate în solventul arganic. Din extractul toluenic se recoltează un alicot de 1 ml care se tratează cu 3 ml soluție alcoolică de KOH 4%.

Colorimetrarea probelor se face la 540 nm față de toluen. Valorile densităților optice determinate pentru probele *A* și *B* se transformă în μg acid pivuric conținut în 0,1 ml soluție cu ajutorul unei curbe etalon.

Construirea curbei etalon. Soluția de piruvat de sodiu 0,01 M este diluată cu apă distilată conform tabelului de mai jos :

ml soluție 8	ml apă distilată	μg privat/ 0,1 ml
0,00	0,10	0
0,01	0,09	10
0,02	0,08	20
0,03	0,07	30
0,04	0,06	40
0,05	0,05	50
0,06	0,04	60
0,07	0,03	70

La fiecare probă se adaugă cîte 1 ml soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină și se incubează 30 minute la 60°C. După răcirea probelor se adaugă 2 ml toluen și se agită bine în vederea unei extracții optime. Din stratul toluenic se recoltează alicoți a 1 ml care se tratează cu 3 ml soluție alcoolică de KOH. Se dezvoltă o culoare roșu-brun caracteristică hidrazonei acidului piruvic, în mediu alcalin, care se colorimetrează.

Se construiește o curbă etalon cu densitățile optice pe ordonată și cu μg piruvat/probă pe abscisă.

Calculul rezultatelor. Activitatea GPT din preparatul proteic, exprimată în moli acid piruvic / 1 ml / 37°C se calculează după formula :

$$x = \frac{(a - b) \cdot 10}{30 \cdot 110} \cdot \frac{0,7}{0,1}$$

unde *a* — valoarea concentrației de piruvat din proba *A*, în μg/0,1 ml ;
b — valoarea concentrației de piruvat din proba *B*, în μg/0,1 ml
10 — coeficient de transformare a activității GPT a 1 ml preparat proteic ;
30 — numărul de minute cît decurge activitatea enzimatică ;
110 — miliechivalentul acidului piruvic ;
0,7/0,1 — factor de corecție a volumului — determinare a activității enzimatice/curbă etalon.

* * *

Importanța dozării activității GOT și GPT serice în diagnoza clinică GOT și GPT sînt enzime celulare, implicate în metabolismul tisular, iar prezența lor în plasmă este datorată numai faptului că sîngele circulă prin zone cu activitate transaminazică mare. Este presupus că exacerbarea activității enzimatice în ser este datorată unor leziuni la nivelul celulelor unui organ. Studii pe animale de experiență au demonstrat o bună corelație între creșterea activităților enzimatice din ser și concentrația unei toxine sau virulența unui virus injectat. Studii clinice, de asemenea, au arătat o corelație strînsă între severitatea unei maladii și gradul în care o activitate enzimatică crește în serul sanguin.

Astfel, de exemplu, *hepatita acută* este totdeauna însoțită de creștere a activității transaminazelor serice : GOT crește de 10—150 ori (valoarea medie — de 50 ori), iar GPT crește de 20—200 ori (valoarea medie — de 100 ori). În circa 85% din cazuri, raportul GOT/GPT (raport DeRitis) care în serul normal este 1,3 scade la 1,0 în prima săptămînă de boală, iar pe măsură de hepatita progresează atinge și valori de 0,3—0,4.

În *hepatita cronică* și în *ciroza ficatului* creșterea activității transaminazelor serice este de numai 3—15 ori. În ciroza decompensată raportul DeRitis este mai mare decît 1,5.

Creșterea activității GOT din ser, corelată cu creșterea activității altor enzime (creatin fosfokinaza, lactat dehidrogenaza) poate permite stabilirea unui diagnostic diferențial de miocardită, pericardite, infarct miocardic, perturbări ale ritmului cardiac etc.

6.12. DOZAREA ACTIVITĂȚII RIBONUCLEAZEI

Ribinucleaza A (din pancreas bovin) este o endonuclează (nucleotidil transferază) care scindează RNA conform reacției generale :

$$\text{ribonucleat} \xrightarrow{H_2O} \text{oligonucleotide}$$

Enzima atacă specific nucleotidele pirimidinice la gruparea 3'-fosfat și scindează legătura 5'-fosfat cu nucleotidul vecin... GpApUp/Cp/GpGpCp/ /Up/ApGpGp... produșii finali fiind primidin-3'-fosfați și oligonucleotide cu grupări terminale pirimidin-3'-fosfat.

Hirs și colab. disting după ribonucleaze : *A* (omogenă cromatografic și *B* (eterogenă cnomatografic), iar Taborsky pune în evidență existența unei forme inactive *(A)* și a patru forme active *(B, C, D, E)*. Forma D descrisă de Taborsky coresponde formei *A* a lui Hirs iar formele *B* și *C* corespund RN-azei B a lui Hirs.

RN-aza din pancreasul bovin are 124 resturi de aminoacizi, patru punți disulfurice și situsul ei activ conține un rest de histidină și unul de lizină hiper-reactivi.

Este o enzimă deosebit de stabilă. Este inactivată la 85°C și reactivată prin răcire. Are un punct izoelectric de 7,8 și un pH optim de acțiune 7,0—7,5.

Enzima prezintă deosebite aplicații clinice, inhibînd creșterea tumorilor, provocînd remisia clinică în leucemia granulocitică cronică, și este și analgezic (oral, parental sau administrare topică).

Experiența 78. DOZAREA ACTIVITĂȚII RNazei PANCREATICE PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ

Principiul metodei. RNA rămas nehidrolizat este precipitat cu acetat de uranil în acid percloric, iar produșii de reacție acido-solubili sînt dozați la 300 nm.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1 M, pH 5,0 ;

2. Soluție substrat RNA 1 mg/ml (dizolvarea RNA se face în apă distilată la care se adaugă cîteva picături de NaOH 10% ; soluția astfel obținută se supune dializei față de apă distilată pentru a îndepărta oligonucleotidele, nucleotidele, ionii etc.; apa se schimbă la 2—3 ore ; după terminarea dializei se ajustează pH soluției la valoarea 5,0) ;

3. Soluție de acetat de uranil 0,75%, preparată în acid percloric 25%;

4. Preparat proteic cu activitate RN-azică (1 g țesut pancreatic este triturat cu 30 ml apă distilată ; după 2 ore extracție la 4° C, omogenatul este centrifugat la 6 000 t.pm. timp de 15 minute ; se păstrează supernatantul.)

Modul de lucru. În eprubetele de testare a tctivității RN-azei se pipetează:

0,4 ml soluție tampon (1) ;
1,5 ml soluție RNA (2) ;

apoi se incubează 15 minute la 25° C pentru preechilibrarea termică. Reacția enzimatică este inițiată prin adăugarea :

0,1 ml preparat enzimatic

și este condusă timp de cinci minute la 25° C și apoi stopată cu

0,25 ml soluție de acetat de uranil (3).

Probele sînt lăsate la frigider timp de 30 minute, iar conținutul lor este centrifugat 30 minute la 5 000 r.p.m. Se măsoară densitatea optică la 300 nm față de apă distilată — $D.O._P$.

Fiecare probă este însoțită de un martor, în care se introduc aceleași componente, dar agentul de stopare (soluția 3) este introdus înaintea preparatului enzimatic. De asemenea se măsoară densitatea optică a martorului, la 300 nm, față de apă distilată — $D.O._M$.

Calculul rezultatelor. Numărul de unități RN-azice în 1 ml preparat enzimatic cînd acționează asupra substratului timp de 1 minut la 25° C este dat de formula :

$$(D.O._P - D.O._M) \times 10 \times \frac{1}{5}$$

6.13. DOZAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI

Lipazele sînt un grup de esteraze care catalizează hidroliza substratelor emulsionate, conform reacției generale :

triacilglicerol + H_2O ⟶ diacilglicerol + acid gras

Aceste enzime prezente în organisme animale, vegetale și în microorganisme joacă un rol important în metabolismul lipidelor.

Lipaza pancreatică este produsă de celulele acinoase ale pancreasului eliberată în duoden, unde joacă un rol esențial în digestia intraluminară și în absorbția lipidelor alimentare. Acțiunea lipazei pancreatice este favorizată de acizii biliari — care transformă picăturile mari de grăsime în emulsii fine, ușor de atacat. Lipaza pancreatică se prezintă sub formă puțin activă în sucul pancreatic și este activată de sărurile biliare și ionii de calciu. A fost pus în evidență un efect inhibitor al acizilor grași (în special cei cu catene de lungimi medii) asupra lipolizei, motiv pentru care „in vitro" se adaugă albumină. Această proteină are rolul de acceptor al acizilor grași eliberați în urma hidrolizei catalizate enzimatic.

S-a demonstrat că lipaza pancreatică, în stare pură, catalizează hidroliza triacilglicerolilor ce conțin acizi grași cu C_4—C_{16}, a diacilglicerolilor, a esterilor metil ai acizilor grași, dar nu catalizează hidroliza fosfolipidelor și monoacilglicerolilor. Introducerea de substituienți sau de nesaturare la nivelul C_{2-5} al resturilor de acizi grași din structura substratului, conduce la o rezistență relativă a substratului față de lipază.

Experiența 79. DOZAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI PANCREATICE DUPĂ WILLSTÄTTER

Principiul metodei. Acizii grași superiori rezultați prin hidroliza triacilglicerolilor, în prezența lipazei pancreatice, sînt extrași cu solvenți organici și dozați titrimetric cu o soluție alcoolică de NaOH, în prezența fenolftaleinei — ca indicator.

Reactivi și soluții

1. Substrat — ulei de măsline;

2. Emulsia substratului (într-un pahar Erlenmayer se introduc 10 ml ulei de măsline, 2 ml soluție deoxicolat de sodiu 2% în calitate de agent emulsionant și 1 ml soluție ovalbumină 0,05% în calitate de agent stabilizant, se agită puternic cîteva minute, pînă cînd se obține o emulsie albă, lăptoasă, stabilă);

3. Soluție alcoolică de NaOH 0,2 N, proaspăt preparată;

4. Soluție alcoolică de fenolftaleină 1%;

5. Amestecul metanol : eter etilic (9 : 1);

6. Preparat proteic cu activitate lipazică (1 g pancreas se triturează cu 10 ml apă distilată, extracția este realizată timp de o oră, după care omogenatul este centrifugat la 6 000 r.p.m. timp de 15 minute; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. La substratul emulsionat (2) se adaugă 1 ml preparat proteic (6), reacția enzimatică avînd loc la temperatura camerii timp de 30 minute, după care este stopată cu 20 ml amestec metanol : eter etilic (5) — care solvatează produșii de reacție și precipită proteinele din mediu.

Aciditatea amestecului, reprezentată de acizii grași superiori eliberați în urma hidrolizei enzimatice a fost titrată cu soluția alcoolică de NaOH 0,2 N, în prezența fenolftaleinei.

Fiecare probă a fost însoțită de un martor, în care reacția enzimatică a fost stopată la timpul zero. Activitatea lipazei pancreatice a fost determinată de diferența dintre numărul de mililitri de soluție alcoolică de NaOH 0,2 N folosiți pentru titrarea probei și martorului.

Cazul rezultatelor:

$$(\text{ml NaOH}_{\text{proba}} - \text{ml NaOH}_{\text{martor}}) = X \text{ ml}$$

Unități lipazice (μmoli NaOH/ml/min/temperatura camerii):

$$y = \frac{X \cdot 200}{30}$$

6.14. DOZAREA FOSFATAZEI ALCALINE

Această enzimă este puțin specifică, catalizînd hidroliza unei mari varietăți de esteri fosforici ai alcoolilor primari și secundari, ai alcoolilor zaharuri, alcoolilor ciclici, fenolilor și aminelor. Fosfataza alcalină a fost izolată, purificată și caracterizată biochimic din laptele bovin, țesut hepatic bovin, intestin de vițel, placentă umană, *E. coli* etc.

Fosfataza alcalină din *E. coli* este o proteină cu o masă moleculară de 80 000 daltoni ce conține doi atomi de zinc per moleculă și cu o structură oligomeră, fiind constituită din doi monomeri identici. pH optim de acțiune este 8,0 — punctul izoelectric — 4,5.

Experiența 80. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE UTILIZÎND β-GLICEROFOSFATUL CA SUBSTRAT

Principiul metodei. ß-glicerofosfatul este hidrolizat sub acțiunea catalitică a fosfatazei alcaline, iar ortofosfatul eliberat este dozat prin metoda F i s k e-S u b b a r o w (v. Experiența 73).

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Tris-HCl, 0,1 M pH 9,0;
2. ß-glicerofosfat, soluție 0,01 M, preparat în tamponul 1;
3. Soluție $MgCl_2$ 0,1 M;
4. Acid tricloracetic, soluție 10%;
5. Reactivi pentru dozarea ortofosfatului eliberat, prin metoda Fiske-Subbarow (v. Experiența 73).
6. Preparat proteic cu activitate enzimatică (1 g țesut hepatic de la șobolan este triturat cu 10 ml soluție tampon 1, extracție o oră la 4°C, centrifugare la 6 000 t.p.m., 15 minute; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din:

0,5 ml soluție ß-glicerofosfat (2);
1,0 ml soluție $MgCl_2$ (3);
3,0 ml soluție tampon (1);

0,5 ml soluție proteică cu activitate enzimatică și este incubat la 37°C timp de 15 minute, după care reacția enzimatică este stopată cu 2,0 ml soluție acid tricloracetic (4).

Proteinele precipitate sînt îndepărtate prin filtrare, iar în filtrat este dozat colorimetric fosforul eliberat:

4,0 ml filtrat
0,8 ml soluție molibdat de amoniu
0,2 ml soluție eiconogen

Amestecul este incubat timp de 5 minute la 37°C, pentru dezvoltarea culorii, răcit și colorimetrat la 660 nm.

Pentru fiecare probă se realizează și un martor, cu același conținut al amestecului de reacție, dar în care soluția de acid tricloracetic se pipetează înaintea soluției de enzimă.

Calculul rezultatelor. Se efectuează o curbă etalon, ca în modul descris la Experiența 73. Cu ajutorul acestei curbe etalon, transformăm densitățile optice obținute pentru martor și probă în $\mu g\ P_i$.

Activitatea fosfatazei alcaline, exprimată în $\mu g\ P_i$ eliberat de 1 ml preparat enzimatic într-un minut la 37°C, se calculează după formula:

$$(\mu P_{i\ proba} - \mu P_{i\ martor}) \cdot 2 \cdot \frac{1}{15} \cdot \frac{7}{4}$$

se înmulțește cu 2 pentru a exprima la 1 ml preparat enzimatic, se împarte la 15 pentru a exprima la 1 minut, se înmulțește cu $\frac{7}{4}$ ca o corecție de volum, deoarece din cei 7 ml mediu de reacție, am utilizat numai 4 ml filtrat în dozarea concentrațiilor de fosfor.

Observații.

În cadrul aceluiași experiment se va studia modul în care variază viteza de reacție cu concentrația de activator. Cu condiția menținerii constante a celorlalte componente ale amestecului de reacție se va varia concentrația de $MgCl_2$ după cum urmează:

ml soluție $MgCl_2$ 0,1 M	ml soluție tampon 1	μ moli $MgCl_2$ în amestec
0	4,0	0
0,5	3,5	50
1,0	3,0	100
1,5	2,5	150
2,0	2,0	200
2,5	1,5	250
3,0	1,0	300

Pentru fiecare 7 probe se vor efectua 7 martori, iar rezultatele experimentale vor fi redate într-un grafic: viteza de reacție ($\mu g\ P_i$ /ml/min/ 37°C) în funcție de μmoli $MgCl_2$ în mediu de reacție.

Experiența 81. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE UTILIZÎND CA SUBSTRAT p-NITROFENIL FOSFATUL

Principiul metodei. Cantitatea de p-nitrofenol eliberat per unitatea de timp, determinată în mediu alcalin la 400—420 nm, este o măsură a activității fsfatazei :

$$\text{p-nitrofenil fosfat} + H_2O \longrightarrow \text{p-nitrofenol} + P_i$$

Reactivi și soluții.

1. Soluție tampon substrat (tampon glicină-KOH 0,1 M, pH 10 ; p-nitrofenil fosfat 1,25 mM : se prepară prin dizolvarea a 46,4 mg p-nitrofenil fosfat în 100 ml soluție tampon) ;

2. Soluție NaOH 0,05 N ;

3. Ser sanguin uman proaspăt.

Modul de lucru : Amestecul de reacție care constă din :

2,00 ml soluție tampon substrat (1) ; 0,05 ml ser este incubat 30 minute la 25°C, după care reacția enzimatică este stopată cu 10,0 ml soluție NaOH 0,05 N.

Densitatea optică este citită la 405 nm față de un martor preparat similar, dar în care serul este adăugat după soluția de NaOH.

$$\Delta \text{ D.O.}_{405} = (\text{D.O.}_{405\ \text{proba}} - \text{D.O.}_{405\ \text{martor}})$$

iar activitatea enzimatică exprimată în U/l ser este calculată după formula :

$$\frac{\Delta D \cdot O_{405} \cdot 12{,}5 \cdot 1000}{30 \cdot 18{,}5 \cdot 0{,}05} = \Delta D \cdot O_{405} \cdot 434$$

unde 18,5 $cm^2/\mu mol$ este coeficientul de extincție la 405 nm ;

12,5 este volumul final ;
0,05 este volumul serului ;
30 este numărul minutelor de reacție enzimatică.

Dacă ΔD.O.$_{405}$ este mai mare de 0,8 — se recomandă diluarea a 0,1 ml ser cu 0,9 ml soluție fiziologică de NaCl și reluarea determinării, în calculul rezultatelor ținîndu-se seama de factor de diluție.

Valori normale : 18—63 U/l ser (adulți de 18—85 ani). Limita superioară normală a fosfatazei alcaline la copii este de 150 U/l ser.

Experiența 82. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE UTILIZÎND CA SUBSTRAT FENIL FOSFATUL

Principiul metodei. În mediu alcalin, fenolul eliberat din reacția :

$$\text{fenilfosfat} + H_2O \rightarrow \text{fenol} + P_i$$

are un maxim de absorbție la 287 nm, lungime de undă la care fenilfosfatul are o absorbție neglijabilă. Valorile de densități optice cuprinse în domeniul 0,15—0,50 sînt proporționale cu cantitatea de enzimă din mediul de reacție.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon carbonat-borat 0,01 M pH 10.
2. Soluție fenilfosfat disodic 0,01 M preparată în tampon canbonat-borat.
3. Soluție tampon Tris-acid acetic 0,01 M pH 8,8 care conține acetat de magneziu 0,01 M.
4. Preparatul enzimatic, diluat în soluția tampon 3.
5. Soluție NaOH 0,4 N.

Modul de lucru

Mediul de reacție conține :

— 2,9 ml soluție substrat (2).

— 0,1 ml preparat enzimatic diluat corespunzător.

După incubarea mediului de reacție 5 minute la 37°C, procesul enzimatic este stopat cu 1 ml soluție NaOH 0,4 N.

Proba este spectrofotometrată la 287 nm față de apă distilată.

Calculul rezultatelor

O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă necesară pentru a elibera 1 μmol fenol într-un minut, în condițiile descrise, ceea ce corespunde unei valori a extincției de 2,6.

6.15. DOZAREA FOSFATAZEI ACIDE

Fosfatazele acide catalizează aceeași reacție generală și se găsesc aproape în toate celulele umane, animale și vegetale. O înaltă activitate enzimatică a fost depistată în eritorocite și în prostată. Fosfatazele acide din eritrocitele umane sînt inhibate de formaldehidă, în timp ce acelea din serul normal uman sînt selectiv inhibate de anionul F^-. Fosfataza din prostată este inhibată de tartrat 20 mM, caracteristică ce permite determinarea separată a fosfatazei acide provenite din prostată. În clinica medicală, dozarea activității fosfatazei acide este mult utilizată în diagnoza și controlul terapiei carcinomului de prostată.

Experiența 83. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE UTILIZIND CA SUBSTRAT β-GLICEROFOSFATUL

Principiul metodei. β-glicerofosfatul este hidrolizat sub acțiunea catalitică a fosfatazei acide, iar ortofosfatul eliberat este dozat prin metoda Fiske-Subbarow.

Reactivi și soluții.

1. Soluție tampon acid acetic — acetat de sodiu, 0,1 M, pH 5.5.
2. Soluție β-glicerofosfat, preparată în tampon 1, pH trebuie ajustat la valoarea 5,5 ;
3. Acid tricloracetic, soluție 10% ;
4. Reactivi pentru dozarea ortofosfatului eliberat, prin metoda Fiske-Subbarow (v. Experiența 73) ;

5. Preparat proteic cu activitate enzimatică (1 g țesut tubercul de cartof este triturat cu 10 ml soluție NaCl 0,3%, extracție o oră la 4°C, centrifugare la 6 000 t.p.m., 15 minute ; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru : Amestecul de reacție constă din :

1 ml soluție β—glicerofosfat (2) ; 3,5 ml soluție tampon (1) ; 0,5 ml soluție proteică cu activitate enzimatică și este incubat la 37°C timp de 15 minute, după care reacția enzimatică este stopată cu 2,0 ml soluție acid tricloracetic (4).

Proteinele precipitate sînt îndepărtate prin filtrare, iar în filtrat este dozat colorimetric fosforul eliberat ;

4,0 ml filtrat, 0,8 ml soluție molibdat de amoniu, 0,2 ml soluție eiconogen. Amestecul este incubat timp de 5 minute la 37°C, pentru dezvoltarea culorii, răcit și colorimetrat la 660 nm.

Pentru fiecare probă se realizează și un martor, cu același conținut al amestecului de reacție, dar în care soluția de acid tricloracetic se pipetează înaintea soluției de enzimă.

Calculul rezultatelor. Se efectuează o curbă etalon, ca în modul descris la Experiența 73. Cu ajutorul acestei curbe etalon, transformăm densitățile optice obținute pentru martor și probă în μg P_i.

Activitatea fosfatazei acide, exprimată în μg P_i eliberat de 1 ml preparat enzimatic într-un minut la 37°C se calculează după formula (v. Experiența 80).

$$(\mu g\ P_{i\ proba} - \mu g\ P_{i\ martor}) \cdot 2 \cdot \frac{1}{15} \cdot \frac{7}{4}$$

Observație. În cadrul aceluiași experiment se va studia modul în care variază viteza de reacție cu pH mediului. În acest scop se vor prepara soluții tampon acid acetic — acetat de sodiu 0,1 M într-o gamă de pH variind de la 4,0 la 6,0. De asemenea, se vor prepara soluții de substrat la valorile de pH respective și se va controla riguros, la un pH-metru, valorile de pH ale mediului de reacție.

Rezultatele experimentale vor fi înglobate într-un grafc în care schițăm pe abscisă pH mediului, iar pe ordonată viteza de reacție determinată la fiecare valoare de pH testată.

Experiența 84. DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ACIDE UTILIZÎND CA SUBSTRAT p-NITROFENIL FOSFATUL

Principiul metodei. Este determinată activitatea fosfatazei acide din serul sanguin uman în prezența p-nitrofenil fosfatului, cînd cantitatea de p-nitrofenil eliberată este dozată la 405 nm. Reacția enzimatică este stopată cu NaOH. Fosfataza acidă de origine prostatică poate fi determinată prin măsurarea activității acestei enzime în prezența și în absența tartratului.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon substrat (tampon citrat 50 mM, pH 4,8 ; p-nitrofenil fosfat 5,5 mM — se dizolvă 0,41 g acid citric, 1,125 g citrat de sodiu și 0,203 g p-nitrofenil fosfat în 100 ml apă distilată — se ajustează pH final la valoarea 4,8) ;

2. Soluție tartrat de sodiu 0,4 M ;
3. Ser uman proaspăt ;
4. Soluție NaOH 0,1 N.

Modul de lucru. În două probe diferite, notate A și B se pipetează :

	A	B
soluție tampon substrat (1)	1,0 ml	1,0 ml
soluție tartrat (2)	—	0,05 ml
ser	0,2 ml	0,2 ml

și se incubează 30 minute la 25°C, după care reacția enzimatică este stopată cu

soluție NaOH 0,1 N	2,0 ml	2,0 ml

Se măsoară densitățile optice ale probelor *A* și *B*, față de un martor, fără tartrat la care serul este adăugat după soluția de NaOH.

Pentru determinarea activității fosfatazei acide din ser se aplică formula generală :

$$\text{Activitatea (U/l)} = \frac{1\,000 \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta D \cdot O}{\Delta t}$$

unde V este volumul amestecului de reacție (ml) ;

v este volumul probei (ml) ;
ε este coeficientul de extincție ($cm^2/\mu mol$) ;
d este drumul optic (cm) ;
Δt este intervalul de timp cît s-a testat activitatea enzimatică ;
ΔD·O este modificarea densității optice în intervalul Δt.

iar în cazul cocnret de față :

$$\text{Activitatea (U/l)} = \frac{1\,000 \cdot 3{,}2}{18{,}5 \cdot 1 \cdot 0{,}2} \cdot \frac{\Delta D \cdot O}{30} = 28{,}8\ \Delta DO$$

unde 18,5 $cm^2/\mu mol$ este coeficientul de extincție, în mediu alcalin, la 405 nm, al p-nitrofenolului.

Activitatea fosfatazei prostatice este obținută prin diferența dintre activitățile probelor *A* și *B*, iar activitatea totală a fosfatazei acide serice este dată de proba *A*. Dacă dorim să măsurăm numai activitatea prostatică, se prepară probele *A* și *B* și se citește *A* față de *B*.

Volumul amestecului de reacție din proba *B* este cu 0,05 ml mai mare, diferență de volum ce poate fi neglijată.

Dacă determinările nu se efectuează la 405 nm este necesară realizarea unei curbe etalon — D.O./concentrația p-nitrofenol.

Valori normale

Activitatea totală — pînă la 5,5 U/l ;
Activitatea prostatică — pînă la 2 U/l.

6.16. DOZAREA ACTIVITĂȚII AMILAZEI

α-Amilaza hidrolizează legăturile α-1,4-glucan din polizaharide : amidon, amilopectină, glicogen și produșii lor de degradare cu o lun-

gime a catenei de cel puțni trei resturi de D-glucoză. Hidroliza catenei polizaharidului are loc pe principiul „atacului multiplu": odată complexul enzimă-substrat format, enzima poate hidroliza unele legături din polimer, succesiv, înainte ca enzima să fie din nou într-o stare liberă. În condiții optime, numărul de astfel de reacții hidrolitice pentru aceeași catenă polizaharidică este de aproximativ șase pentru amilaza din pancreasul de porc și de aproximativ trei pentru amilaza din saliva umană.

Dintre diferitele preparate de amidon, amidonul solubil preparat după Zulkowsky sau după Linthner reprezintă cele mai bune substrate amilolitice. Alte surse de amidon solubil permit înregistrarea unor activități catalitice inferioare. Concentrația optimă de substrat (cu amidon Zulkowsky) este de 10 mg/ml amestec de reacție și pH optim de acțiune este 6,9. În mediul de reacție se adaugă ioni de Ca^{2+} într-o concentrație finală de 10 mM pentru a activa amilaza. Calciu (1 atom gram per moleculă) este atît de puternic legat la molecula enzimei încît nu poate fi îndepărtat decît prin dializă față de o soluție EDTA sau prin electrodializă.

Enzima se găsește în microorganisme, în plante (activitate mare în cerealele germinate) și în animale (în granulele secretorii ale celulelor glandelor salivare, în pancreas și în secreția acestor organe).

Oamenii sănătoși prezintă o slabă activitate amilazică în sînge, ser și urină. Lezarea țesuturilor care sintetizează α-amilază, în particular pancreasul, are ca rezultat eliberarea enzimei din celulele parenchimului și apariția ei în ser.

Datorită masei moleculare relativ mici (aproximativ 40 000) proteina este filtrată de glomeruli și excretată în urină.

Activitatea amilazei poate fi măsurată, urmărind scăderea vîscozității unei soluții de amidon, scăderea turbidității unei suspensii de amidon, scăderea în intensitatea reacției amidon-iod și creșterea numărului grupărilor reducătoare. Metodele ultimei grupe îndeplinesc cerințele Comisiei de Enzime a Uniunii Internaționale de Biochimie (EC—IUB); prin celelalte metode transformarea Unităților Internaționale trebuie realizată pe baza determinării activității unor preparate standard de enzimă sau seruri standard.

Experiența 85. DOZAREA ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI, DUPĂ METODA DESCRISĂ DE HOSTETTLER ȘI COLAB.

Principiul metodei. Amidonul este hidrolizat, sub acțiunea catalitică a α-amilazei, la fragmente a căror grupări reducătoare semiacetalice pot fi determinate cu acid 3,5-dinitrosalicilic. Concentrația de acid nitroaminosalicilic format, măsurată colormetric, corespunde activității enzimatice.

Reacții și soluții

1. Soluție tampon Na_2HPO_4—KH_2PO_8 20 mM, pH 6,9 ce conține și NaCl 10 mM;

2. Soluție amidon 1%, preparată în tampon 1;

3. Reactiv 3,5-dinitrosalicilic (se dizolvă la cald 10 g acid 3,5-dinitrosalicilic în aproximativ 300 ml apă distilată, se adaugă 400 ml NaOH 1 N

și 300 g tartrat de sodiu și potasiu — după dizolvare se adaugă la un volum final de 1 l).

4. Soluție standard de maltoză (100 mg%).

Modul de lucru. Amestecul de reacție care constă din :

1,00 ml soluție tampon 1 ;

1,00 ml soluție substrat 2 ;

0,05 ml soluție cu activitate enzimatică, este incubat la 25°C timp de 10 minute, după care reacția este stopată cu 2,00 ml reactiv dinitrosalicilic 3.

Probele sînt incubate 5 minute pe baie de apă la fierbere, răcite sub jet de apă și după 20—60 minute sînt colorimetrate la 546 nm față de apă distilată.

Pentru determinarea zaharurilor reducătoare preexistente în mediul de reacție la timpul 0, se prepară un martor cu același conținut ca proba, în care însă soluția enzimatică trebuie introdusă după reactivul dinitrosalicilic. Se colorimetrează și martorul față de apă distilată. Dacă $D.O._{proba} - D.O._{martor}$ este mai mare de 1,5 se procedează la diluarea soluției enzimatice.

Construirea curbei etalon. Din soluția de maltoză (100 mg%) se prepară diluții după cum urmează :

Nr	ml soluție maltoză	ml apă distilată	µmoli maltoză
1	0	1,05	0
2	0,2	0,85	0,5
3	0,4	0,65	1,0
4	0,6	0,45	1,5
5	0,8	0,25	2,0
6	1,0	0,05	2,5

În fiecare din cele 6 eprubete se mai adaugă 1 ml soluție substrat (2) și 2 ml reactiv dinitrosalicilic (3), apoi se incubează 5 minute pe o baie de apă în fierbere. După răcirea probelor se așteaptă 20—60 minute și apoi se colorimetrează la 546 nm față de apă distilată. Se trasează o curbă etalon, indicînd pe abscisă µmoli maltoză în mediul de reacție, iar pe ordonată — densitățile optice.

Calculul rezultatelor. Se transformă densitățile optice citite pentru probe și martori în µmoli maltoză cu ajutorul curbei etalon, se scade valoarea martorului din cea a probei — iar rezultatele obținute trebuie multiplicate cu 2 pentru a fi exprimate astfel :

µmoli maltoză eliberați enzimatic/1 ml/min/25°C sau se înmulțește cu 4 950 pentru a fi exprimate în U/l.

Observații : Prin această metodă se poate determina activitatea amilazică în urină, cînd se înregistrează o distribuție logaritmică.

Pentru determinarea activității amilazice din sucul duodenal, acesta se diluează 1 : 200 cu NaCl 0,9%, iar calculul rezultatelor se face după formula :

$$U/l = 992 \times D.O.$$

Dacă se testează activitatea α-amilazei din țesuturi se procedează la triturarea acestuia și la centrifugarea omogenatului cînd se păstrează supernatantul.

Cînd, în scopuri clinice, se testează secreția α-amilazei de către pancreas, se face o injecție cu pancreozimină la o doză de 1 U/kg corp și se determină activitatea amilazei din urină prin procedeul descris.

Experiența 86. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI CU SUBSTRATE INSOLUBILE COLORATE

Principiul metodei: Amidonul solubil este colorat cu Cibachrom Blue F3G-A și insolubilizat prin înrețelare cu 1,4-butandiol glicid eter (C e s k a și colab.). Amidonul insolubilizat și colorat este capabil să se îmbibe în medii apoase și este hidrolizat de α-amilază. După ce reacția a fost stopată, produșii solubili colorați sînt determinați fotometric. Activitatea α-amilazei este determinată prin comparare cu un standard.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Na_2HPO_4—NAH_2PO_4 0,02 M, pH 7,0 ce conține NaCl 0,05 M;

2. Soluție substrat tampon (se suspendă 100 mg polimer de amidon albastru în 10 ml soluție tampon 1, se pipetează sub agitare — se prepară imediat înaintea folosirii);

3. Soluție NaOH 0,5 M;

4. Soluție standard de α-amilază (se dizolvă în 1 mg α-amilază în 10 ml soluție 6% de albumină serică bovină preparată în tampon (1) — cînd rezultă o soluție stoc, stabilă patru săptămîni la 4°C, care se diluează 1 : 100 imediat înaintea folosirii).

Modul de lucru. Se realizează două medii de reacție, în paralel, pentru probă și pentru standard (4), astfel:

4,0 ml soluție substrat tampon (2); incubare 10 minute la 25°C; 0,2 ml probă/standard; se incubează, sub agitare continuă, 10 minute la 25°C, apoi reacția enzimatică este stopată prin adăugare de 1,0 ml soluție NaOH.

Probele se centrifughează, iar supernatantele se colorimetrează față de un martor preparat similar cu 0,2 ml apă în loc de 0,2 ml probă sau standard. Colorimetrările se realizează la 620 nm.

Calculul rezultatelor

$$\text{U/l din probă} = \frac{D \cdot O_{\text{proba}}}{D \cdot O_{\text{standard}}} \cdot \text{U/l din standard}$$

O unitate enzimatică reprezintă acea cantitate de enzimă care permite formarea unei grupări reducătoare într-un minut la 25°C.

Valori normale

bărbat	88— 282 U/l ser	femeie	86— 226 U/l ser
	125—1590 U/l urină		192—1310 U/l urină

Experiența 87. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI PRINTR-O METODĂ ADAPTATĂ DE NOI DUPĂ METAIS ȘI BIETH

Principiul metodei. Amilaza hidrolizează o soluție de amidon, substratul rămas nehidrolizat este dozat spectrofotometric la 565 nm, în urma reacției cu iod.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Na_2HPO_4 0,2 M — acid citric 0,1 M, pH 7 ;
2. Soluție amidon 0,4% preparată în tampon (1) ;
3. CH_3COOH, soluție 6% ;
4. Soluție iod N/1500 ;
5. Soluție proteică cu activitate enzimatică (se prepară prin omogenizarea a 1 g hepatopancreas de la *Mya arenaria* în 10 ml $CaCl_2$ 0,4%. centrifugare la 6 000 r.p.m., cînd se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Dozarea activității enzimatice este efectuată într-un amestec de reacție :

0,3 ml soluție amdion 0,4% (1,2 mg) ;
0,2 ml soluție proteică (5),

care este incubat la 37°C timp de cinci minute, iar reacția enzimatică este stopată cu 5 ml soluție CH_3COOH 6%. Se adaugă :

5 ml soluție iod N/1500

iar complexul violet este colorimetrat la 565 nm față de apă distilată. Pentru determinarea concentrației de amidon prezente inițial în mediul de reacție se prepară o probă control în care același amestec de reacție este stopat la timpul zero.

Calculul rezultatelor. Calcularea activității amilolitice, exprimată în

U/ml/min/37°C

se face utilizînd relația :

$$\frac{D \cdot O_{control} - D \cdot O_{proba}}{D \cdot O_{control}} \cdot 1{,}2 \cdot 5 \cdot 1/5$$

în care $D.O_{control}$ și $D.O_{proba}$ sînt densitățile optice citite la spectrofotometru pentru proba control și pentru proba în care a fost testată activitatea amilolitică a preparatului proteic ;

1,2 reprezintă mg amidon introduse în mediul de reacție ;

x5 pentru a determina unitățile enzimatice din 1 ml preparat proteic ;

x1/5 pentru a determina unitățile enzimatice din 1 ml preparat proteic în decursul a 1 minut de reacție enzimatică.

Observație : În cadrul acestui experiment se va urmări modul în care viteza de reacție este funcție de temperatură. Reacția enzimatică va fi realizată la 30°C—37°C—40°C—50°C— 60°C—70°C timp de cinci minute. La fiecare temperatură va fi determinată viteza procesului enzimatic. Datele experimentale vor fi reprezentate grafic, trasînd pe abscisă temperatura de reacție, iar pe ordonată U/ml/min.

Experiența 88. DOZAREA α-AMILAZEI PRIN METODA WILLSTATTER-SCHUDEL

Principiul metodei. În această metodă, activitatea amilazei este determinată prin dozarea cantității de maltoză rezultată în urma procesului enzimatic. Maltoza, în mediu alcalin, reacționează cu iodul formînd sarea de sodiu a acidului maltobionic, iar excesul de iod este titrat cu tiosulfat.

$$RCHO + I_2 + 3\ NaOH = RCOONa + 2\ NaI + 2\ H_2O$$
$$Na_2S_2O_3 + I_1 + H_2O = Na_2SO_4 + S + HI$$

Se poate stabili, deci, corespondența :

la 1 mol maltoză corespunde 2 moli I_2 și 2 moli $Na_2S_2O_3$ sau

la 1 ml tiosulfat 0,1 N corespunde $17{,}38 = \frac{7{,}9 \cdot 360{,}31}{316{,}26}$ mg maltoză unde 7,9 sînt mg tiosulfat din 1 ml soluție 0,1 N ;

360,31 este masa moleculară a maltozei ;

316,26 reprezintă 2 moli de tiosulfat.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Na_2HPO_4—KH_2PO_4 0,2 M, pH 6,2 ;
2. Soluție amidon 1%, preparată în tampon 1 ;
3. Soluție HCl 1 N ;
4. Soluție NaOH 0,1 N ;
5. Soluție H_2SO_4 0,1 N ;
6. Soluție iod 0,1 N ;
7. Soluție tiosulfat de sodiu 0,1 N ;
8. Soluție NaCl 0,2 N ;
9. Extract proteic total obținut din pancreas (raport de omogenizare și extracție 1 : 30).

Modul de lucru. Amestecul de reacție, cu un conținut :

12,5 ml soluție amidon 1% (2) ; 5,0 ml soluție tampon (1) ; 0,5 ml soluție NaCl 0,2 N (8), este termoechilibrat la 37°C timp de 5 minute, după care reacția enzimatică este inițiată prin adiția de 0,5 ml soluție cu activitate amilazică (9) este incubat la 37 C timp de 10 minute — stoparea reacției fiind realizată cu 1,0 ml HCl 1 N (3). Urmează pipetarea în mediu

2,0 ml I_2 0,1 N (6) ;
3,0 ml NaOH 0,1 N (4).

După 15 minute staționare la temperatura camerii, se adaugă 1,5 ml H_2SO_4 0,1 N (5) ; și se titrează cu soluție 0,1 N de tiosulfat de sodiu.

În toate experiențele de testare a activității amilolitice se prepară și martori, cu un același conținut al mediului de reacție, în care soluția de HCl 1 N este adăugată înaintea preparatului proteic cu activitate enzimatică.

Calculul rezultatelor. Valoarea titrului trebuie înmulțită cu 17,38 (echivalentul în mg de maltoză) și introdusă în formula :

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{0,1875}{0,1875 - x}$$

Amidonul este presupus a fi numai 75% digerabil, deci cantitatea de maltoză care se formează nu este 0,25 g ci 0,1875 ; x este valoarea titrului multiplicată cu 17,38 ; K este egal cu numărul de unități amilazice dintr-un mililitru preparat enzimatic. În ecuația constantei de reacție monomoleculare, *t* reprezintă timpul de reacție.

6.17. DOZAREA ACTIVITĂȚILOR ENZIMATICE DINTR-UN SISTEM CELULOTIC

Celulaza este o enzimă care catalizează hidroliza legăturilor β—1,4 — din cadrul moleculei de celuloză. În literatura de specialitate este întîlnit și termenul de *enzime celulolitice,* care definește complexul de enzime capabile de a hidroliza celuloza nativă și derivații ei.

Studii efectuate pe diverse materiale biologice au indicat prezența acestor enzime într-o serie de microorganisme : *Myrothecium verrucaria, Tricoderma viride, Poliporus versicolor* și într-o serie de nevertebrate capabile de a utiliza celuloza ca hrană, în special moluște. Ierbivorele care prezintă un mod de nutriție vegetarian, sînt direct dependente de prezența unei microflore celulozolitice, care se află în tubul digestiv și care realizează descompunerea celulozei în zaharuri asimliabile. Frecvent asociate cu enzimele celulozolitice sînt *hemicelulazele,* care participă la degradarea hidrolitică a hemicelulozelor — componenți ai celulelor vegetale, care însoțesc celuloza. Hemicelulazele pot fi clasificate în mananaze, galactanaze, xilanaze, arabinaze etc.

Degradarea biologică a celulozei are loc, după M a n d e l s și R e e s e, sub acțiunea a trei enzime, care alcătuiesc sistemul celulozolitic :

$$\text{CELULOZĂ NATIVĂ} \xrightarrow{\text{Enzima } C_1} \text{CELULOZĂ MODIFICATĂ} \xrightarrow{\text{Enzima } C_x} \text{CELOBIOZA} \xrightarrow{\beta\text{—glucozidaza}} \text{GLUCOZĂ}$$

Acești autori nu precizează modul de acțiune al enzimei C_1, dar evidențiază faptul că aceasta este absolut necesară pentru ca sistemul C_x să poată acționa asupra celulozei și s-o zaharifice la celobioză. Enzima C_x poate acționa direct asupra celulozei supuse acțiunii unor agenți fizici, chimici sau biologici. Alți cercetători prezintă diverse scheme ale sistemului celulolitic care hidrolizează celuloza nativă.

Celuloza din *M. verrucaria* hidrolizează lichenina (β—1,3 ; β—1,4), xilanul (β—1,4) glucomananii (β—1,4), luteanul (β—1,6) laminarina (β—1,3), CM-celuloza și sorbitil-β-celobiozidul. Viteza de hidroliză crește cu lungimea și gradul de ramificare al catenei substratului. Celotrioza este hidrolizată de cinci ori mai rapid la nivelul capătului ei nereducător decît la cel reducător.

Celulaza din *Cellvibrio gilvus* atacă oligozaharidele celulozei și oligozaharidele celulozei reduse chimic la a doua și a treia legătură glucozil de la capătul nereductor al catenei.

Celobiaza are și denumirea β—glucozidaza și prezintă o înaltă specificitate pentru glicon și o slabă specificitate pentru aglicon. Aril glucozizii sînt în general substrate mai bune decît alchil glucozizii.

În ultimii ani se acordă o deosebită importanță studiului celulazelor, atît pentru elucidarea unor aspecte de ordin teoretic cît și pentru utilizarea lor în practica industrială. În acest scop aceste enzime au fost purificate atît din culturile microorganismelor mai sus menționate cît și din moluștele *Helix pomatia, Limax flavus* etc. Practic, preparatele celulozolitice pot fi utilizate în industrie pentru prelucrarea materiilor prime celulozice în industria alimentară, textilă, a hîrtiei, în agricultură, în reutilizarea deșeurilor menajere etc. Utilizarea acestor enzime în procesul de desfacere a pereților celulelor vegetale, pentru mărirea randamentului de extracție a diferitelor substanțe, pentru grăbirea proceselor de fermentație la unele produse alimentare, pentru prelucrarea furajelor brute în vederea măririi coeficientului de asimilare, a impulsionat elaborarea unor tehnici de izolare și purificare a celulazelor, precum și investigarea de noi surse de separare a ei.

Noi am evidențiat pentru prima dată prezența unei puternice activități celulozolitice în molusca marină *Mya arenaria,* care trăiește în apele litorale ale Mării Negre, realizînd și un procedeu original de obținere a unui preparat purificat, care a fost brevetat. Preparatul celulozolitic din *Mya arenaria* are o puternică activitate hidrolitică asupra licheninei și CM—celulozei, catalizînd scindarea legăturilor β—1,3 și β—1,4 din stubstratele polizaharidice neasimilabile.

Principiul metodei. Este testată acțiunea hidrolitică a preparatului enzimatic asupra hîrtiei de filtru Whatman no. 1. Zaharurile reducătoare formate sînt dozate cu reactiv 3,5—dinitrosalicilic.

Experiența 89. DOZAREA ACTIVITĂȚII C_1 CELULAZICE, DUPĂ PEITERSEN

Principiul metodei. Este testată acțiunea hidrolitică a preparatului enzimatic asupra hîrtiei de filtru Whatman no. 1. Zaharurile reducătoare formate sînt dozate cu reactiv 3,5—dinitrosalicilic.

Reactivi și soluții.

1. Soluție tampon Na_2HPO_4 0,2 N — acid citric 0,1 N, pH 4,8 ;
2. Hîrtie Whatman no. 1, tăiată mărunt ;
3. Preparat proteic cu activitate celulazică (se omogenizează la un „Waring bendor" 1 g hepatopancreas de *Helix pomatia* cu 20 ml soluție tampon 1, extracție 1 oră la 4°C, centrifugare ; se păstrează supernatantul) ;
4. Reactiv DNS (20 g acid 3,5—dinitrosalicilic, 4 g fenol proaspăt distilat, 1 g sulfit de sodiu și 400 g tartrat de sodiu și potasiu se dizolvă într-un litru de NaOH 2% — soluția se aduce la 2 litri cu apă distilată) ;
5. Soluție glucoză 0,1%, preparată proaspăt în apă distilată.

Modul de lucru. Amestecul de reacție, care constă din :

50 mg hîrtie Whatman no. 1, tăiată mărunt și suspendată în 1 ml soluție tampon 1 ; 1 ml preparat proteic (3) este incubat o oră la 50°C, după care procesul enzimatic este stopat cu 3 ml reactiv DNS, care reacționează cu zaharurile reducătoare eliberate în mediu. Amestecul este incubat 15 minute la fierbere. După răcirea probelor, urmează colorimetrarea lor la 640 nm.

Pentru fiecare probă se prepară și un martor constituit din aceleași componente, dar în care reacția enzimatică este stopată la momentul zero.

Construirea curbei etalon. Din soluția de glucoză 0,1% (5) se prepară diluții la un volum final de 2,2 ml după cum urmează :

ml soluție 5	ml apă distilată	mg glucoză
0,1	2,1	0,1
0,2	2,0	0,2
0,3	1,9	0,3
0,4	1,8	0,4
0,5	1,7	0,5
0,6	1,6	0,6
0,7	1,5	0,7
0,8	1,4	0,8
0,9	1,3	0,9
1,0	1,2	1,0

În fiecare din cele 10 probe se pipetează 3 ml reactiv DNS. Probele sînt incubate 15 minute pe o baie de apă la fierbere, răcite și colorimetrate la 640 nm față de apă distilată. Rezultatele obținute sînt exprimate grafic trasînd pe abscisă mg glucoză în mediu, iar pe ordonată $D.O._{640\ nm}$ Curba etalon prezintă o particularitate : dreapta nu trece prin origine, intersectînd axa abscisă.

Calculul rezultatelor. Valorile densităților optice măsurate pentru probe și martori în cadrul determinării activității C_1 celulazice se transformă cu ajutorul curbei etalon în mg glucoză.

Activitatea enzimatică se calculează astfel :

(mg glucoză $_{proba}$ — mg glucoză $_{martor}$) = mg glucoză eliberate enzimatic de 1 ml enzimă într-o oră la 50°C.

O unitate „filter paper" (FP unit) corespunde la 1 mg glucoză eliberată/ 1 ml/ o oră/ 50°C.

Experiența 90. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII C_x CELULAZICE, DUPĂ PETTERSON ȘI PORATH

Principiul metodei. Metoda se bazează pe dozarea grupărilor reducătoare eliberate de enzimă din substrat — carboximetil celuloză — cu reactiv dinitrosalicilic.

Reactivi și soluții.

1. Soluția tampon Na_2HPO_4 0,2 N — acid citric 0,1 N, pH 6,4 ;

2. Soluție de CM—celuloză 1%, preparată în tampon 1 ;
3.4.5. Reactivi din Experiența 89.

Modul de lucru. Amestecul de reacție care constă din :
2 ml soluție substrat (2) ; 0,2 ml preparat proteic (3) este incubat 10 minute la 50°C, după care reacția enzimatică este stopată cu 3 ml reactiv DNS (4).

Probele sînt incubate timp de 15 minute pe o baie de apă la fierbere, răcite și colorimetrate la 640 nm.

Fiecare probă este însoțită de un martor, în care dozăm zaharurile reducătoare preexistente în amestecul de reacție — prin introducerea reactivului DNS înaintea preparatului proteic cu activitatea celulazică. Martorii sînt și ei colorimetrați la 640 nm față de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Valorile densităților măsurate pentru probe și martori, în cadrul determinării activității C_x celulazice, se transformă cu ajutorul curbei etalon (v. Experiența 89) în mg glucoză.

Activitatea enzimatică se calculează astfel :

$$(\text{mg glucoză}_{\text{probă}} - \text{mg glucoză}_{\text{martor}}) \cdot 5 \cdot \frac{1}{10} = \text{U/ml/min/50°C}$$

Unitatea deactivitate C_x este cantitatea de enzimă care, în condițiile metodei eliberează dintr-o soluție de CM—celuloză o cantitate de zahăr reducător care dă cu reactivul DNS aceeași densitate optică ca 1 mg glucoză.

Experiența 91. DOZAREA ACTIVITĂȚII CELOBIAZEI

Principiul metodei. Metoda se bazează pe determinarea creșterii puterii reducătoare a mediului, cu reactiv dinitrosalicilic, în urma acțiunii hidrolitice a enzimei asupra celobiozei.

Reactivi și soluții.

1. Soluție tampon Na_2HPO_4 0,2 N—acid citric 0,1 M, pH 6,4 ;
2. Soluție celobioză 0,1%, preparată în soluția tampon 1 ;
3.4.5. Reactivii din Experiența 89.

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din : 2 ml soluție celobioză 0,1% ; 0,2 ml preparat proteic (3). Reacția este realizată la 50°C timp de 20 minute. Fiecare probă este însoțită de un martor în care reacția este stopată la timpul zero de reacție.

Probele și martorii sînt prelucrate cu reactiv DNS ca în modul indicat în Experiența 90.

Calculul rezultatelor. Valorile densităților optice măsurate pentru probe și martori se transformă în mg glucoză cu ajutorul unei curbe etalon (v. Experiența 89).

Activitatea celobiazică se calculează astfel :

$$(\text{mg glucoză}_{\text{probă}} - \text{mg glucoză}_{\text{martor}}) \cdot 5 \cdot \frac{1}{20} = \text{U/ml/min/50°C.}$$

6.18. DOZAREA ACTIVITĂȚII CATEPSINEI B

Pepsina acționează asupra proteinelor active, catalizînd hidroliza a aproximativ 30% din totalul legăturilor peptidice din structura substratului. Produșii hidrolizei peptice sînt polipeptide, oligopeptide și mici cantități de aminoacizi. pH optim de acțiune este 1,5—2,0. Pepsina nu hidrolizează keratinele, fibroina din mătase, ovomucoidul, spongina și conchiolina. De asemenea, nu atacă protaminele și produșii hidrolizei proteinelor cu mase moleculare mici. Pepsina catalizează hidroliza unor substrate sintetice, cum este carbobenzoxi-L-glutamil-L-tirozina, scindînd legătura peptidică formată între gruparea carboxil a acidului monoaminodicarboxilic (Glu) și gruparea amino a aminoacidului aromatic (Tyr, Phe). Hidroliza are loc cu o viteză mai mică decît în cazul proteinelor native, iar pH optim de acțiune este 4,0. Substituirea grupării amino a restului de acid glutamic este esențială pentru manifestarea activității enzimatice. Înlocuirea izomerului L cu antipodul D conduce la dispariția activității catalitice.

Această enzimă proteolitică de pH acid se găsește în sucul gastric al mamiferelor, păsărilor, reptilelor și peștilor, în celulele principale din fundusul stomacului de la mamifere, la unele nevertebrate etc.

Acțiunea pepsinei poate fi urmărită prin diferite metode fizico-chimice:

— măsurarea vîscozității soluțiilor proteice — substrat ;

— dozarea produșilor eliberați, solubili în acid tricloracetic ;

— titrarea cu formol a grupărilor amino eliberate în urma acțiunii enzimei ;

— determinarea conținutului în tirozină și triptofan, în produșii de hidroliză ;

— măsurarea directă a absorbției în UV a peptidelor formate după acțiunea enzimei asupra hemoglobinei ;

— determinarea activității de coagulare a laptelui ;

— utilizarea albuminei serice, marcate izotopic, ca substrat.

Principalele *substrate sintetice* ale pepsinei sînt :

Carbobenzoxi-L-glutamil-L-fenilalanina
Carbobenzoxi-L-glutamil-L-tirozina
N-acetil-L-fenilalanil-L-fenilalanina
N-acetil-L-fenilalanil-L-3,5-diiodtirozina.

Experiența 92. DOZAREA ACTIVITĂȚII PEPSINEI PRIN METODA ANSON

Principiul metodei. Pepsina catalizează hidroliza hemoglobinei, permițînd formarea unor compuși solubili în acid tricloracetic. Conținutul în tirozină și triptofan, din acești compuși, este determinat spectrofotometric cu reactiv Folin-Ciocâlteau sau prin măsurarea densității optice la 280 nm.

Reactivi și soluții.

1. Soluția substrat : se dizolvă 1 g hemoglobină în 0,06 N NCl și se aduce la 100 ml (suspensia trebuie să prezinte pH 1,8) ; înaintea folosirii, suspensia se filtrează prin vată de sticlă ;

2. Soluția L(—)-tirozină 1 mM (se dizolvă 181,19 mg tirozină în 1000 ml HCl soluție 0,2 N);

3. Soluții de HCl soluție 0,2 N;

4. Soluții de NaOH 0,5 N;

5. Soluție acid tricloracetic 5%;

6. Reactiv Folin-Ciocâlteau (se dizolvă 10 g $Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$ + 2,5 g $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ + 15 g Li_2SO_4 + 10 ml HCl conc. + 5 ml H_3PO_4 conc. și se aduce la 100 ml cu apă distilată). Înainte de utilizare se diluează o parte din această soluție cu două părți apă distilată.

7. Soluție pepsină: se cîntăresc 50 mg pepsină (35 000 U/g) și se dizolvă în HCl 0,01 N aducîndu-se la 100 ml cu aceiași soluție.

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din 1 ml soluție hemoglobină (1); se termostatează la 25°C — timp de cinci minute, se adaugă 0,2 ml soluție enzimă (7); se incubează 10 minute la 25°C. Reacția enzimatică este stopată cu 2 ml acid tricloracetic (5).

Probele se filtrează, după care se realizează reacția de colorare 1 ml filtrat; 2 ml soluție NaOH 0,5 N (4); 0,6 ml reactiv Folin-Ciocâlteau diluat 1:2. După 10 minute, se determină densitatea optică la 660 nm.

Pentru fiecare probă se prepară un martor, în care acidul tricloracetic este adăugat în mediu înaintea soluției de enzimă.

Construirea curbe ietalon. Din soluția standard de tirozină se realizează diluții după cum urmează:

ml soluție 2	ml HCl 0,2 N	nmoli Tyr/mediu
0,2	4,8	40
0,4	4,6	80
0,6	4,4	120
0,8	4,2	160
1,0	4,0	200

Din soluțiile diluate se ia cîte 1 ml și se adaugă 2 ml NaOH 0,5 N și 0,6 ml reactiv Folin—Ciocâlteu diluat 1:2. Se construiește o curbă etalon, în care pe abscisă se indică nmoli Tyr/ml — iar pe ordonată — densitățile optice măsurate la 660 nm.

Calculul rezultatelor. O unitate de pepsină (U^{Hb}), după Anson, este cantitatea de enzimă care hidrolizează hemoglobina cu o astfel de viteză inițială, în condiții standard (volum total 6 ml ce conține 0,1 g Hb la 35,5 C) încît cantitatea de produși acido-solubili formați într-un minut, în urma hidrolizei, să dea aceeași densitate optică cu reactivul Folin—Ciocâlteu, ca 1 mmol trozină *.

Dacă incubarea este realizată la 25°C în loc de 35,5°C, activitatea enzimei este de 1,82 ori mai mică. Deoarece nu există o linearitate în-

* Față de metoda originală, volumul amestecului de reacție a fost micșorat de cinci ori.

tre activitatea pepsinei și cantitatea de produși acido-solubili formați — activitatea pepsinei trebuie extrapolată la zero sau să fie folosită o curbă standard (curba A n s o n) — viteză de reacție în funcție de concentrația pepsinei (U^{Hb}).

Diferite cantități de enzimă sînt incubate cu substratul, două cum s-a descris la „Modul de lucru". După dozarea produșilor de hidroliză (corectați prin martori) — numărul de nmoli Tyr sînt schițați grafic pe ordonată față de cantitatea de enzimă, indicată pe abscisă, cînd se obține o curbă (Figura 6,3) care permite calcularea numărului de unități enzimatice dintr-un preparat necunoscut.

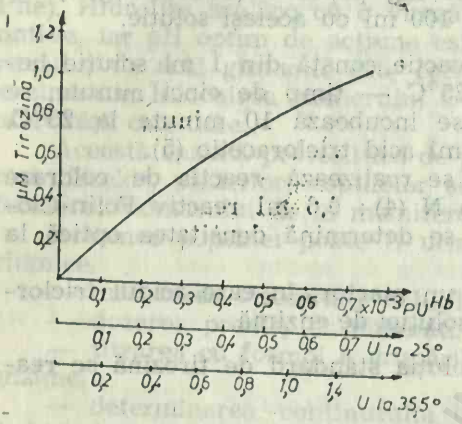


Fig. 6.3. Curba Anson pentru dozarea pepsinei.

Numărul de nmoli Tyr eliberați de 1 ml enzimă într-un minut la 25°C se calculează după formula :

$$\frac{(\text{nmoli}_{\text{probă}} - \text{nmoli}_{\text{martor}}) \cdot 5}{10} \cdot \frac{1}{3{,}2}$$

unde — 5 este factorul de transformare pentru 1 ml soluție enzimă ;
1/10 — este factorul de transformare pentru 1 minut reacție ;
1/3.2 — factorul de transformare : 1 ml filtrat/3,2 ml amestec de reacție.

Poate fi utilizat și un factor de transformare 1/1,82 pentru exprimarea rezultatelor la 35,5°C în loc de 25°C.

Transformarea în unități internaționale se face astfel :

1 U^{Hb} = 1 000 U.I. (35,5°C)
1 U^{Hb} = 549 U.I. (25°C)

Observație experimentală. Din soluția de pepsină (7) se fac diluții (1:1), (1:2), (1:3), (1:4) și (1:5) cu HCl 0,01 N. Din acestea în mediul de reacție se vor pipeta cîte 0,2 ml, deci :

(1) enzimă nediluată — 3, 5 U
(2) enzimă diluată 1 : 1 — 1,75 U
(3) enzimă diluată 1 : 2 1,17 U
(4) enzimă diluată 1 : 3 0,88 U

(5) enzimă diluată 1 : 4 0,70 U
(6) enzimă diluată 1 : 5 0,60 U

Reacția enzimatică este realizată conform procedeului descris anterior, iar rezultatele experimentale sînt reprezentate grafic ca nmoli Tyr/ml/min/25°C în funcție de U pepsină/mediu de reacție.

6.19. DOZAREA ACTIVITĂȚII CATEPSINEI B.

Această enzimă este localizată intralizozomial, avînd un rol important în degradarea intracelulară a proteinelor. Catepsina *B* are o acțiune endopeptidazică, catalizînd hidroliza legăturilor peptidice din interiorul macromoleculei unor substrate proteice naturale. Activitatea acestei enzime poate fi testată și pe substrate sintetice, ca : benzoil-argininamida, benzoil-L-arginin etil-esterul, benzoil-L-arginin-2-naftilamida, α-N-benzoil-DL-arginin-p-nitroanilida, benzoil-L-lizinamida etc. Asupra celor mai multe substrate sintetice catepsina *B* prezintă o activitate maximă la pH 6,0, în timp ce în prezența substratelor naturale pH optim de acțiune este mai acid. Astfel, catepsina B scindează hemoglobina, cu o viteză maximă la pH 4,0—4,5. În centrul catalitic activ al catepsinei B se găsește o grupare tiol, esențială pentru activitatea enzimei — motiv pentru care la determinarea vitezei reacției enzimatice se introduce în mediu un component tiol.

Experiența 93. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII CATEPSINEI B DUPĂ METODA LUI BARRETT

Principiul metodei .În prezența cisteinei și EDTA, catepsina *B* hidrolizează la pH 6 α-N-benzoil-D, L-arginin-2-naftilamida cu formare de 2-naftilamidă. Reacția este stopată cu acid p-cloromercuribenzoic, care în prezență de EDTA blochează grupările SH ale enzimei. Naftilamida eliberată în urma reacției enzimatice, este cuplată cu Fast Garnet GBC, cînd se formează un colorant azoic roșu, solubil în prezență de Tween 20, colorimetrabil la 520 nm.

Reactivi și soluții.

1. Soluție tampon EDTA fosfat pH 6,0 preparat din 0,495 g EDTA Na_2 + 12 g KH_2PO_4 + 2,15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ la 1 litru ;
2. Soluție tampon de incubare se prepară prin dizolvarea a 32,4 mg cisteină în 100 ml soluție tampon 1 ;
3. Soluție stoc de α-N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamidă, 40 mg/ml, preparată în dimetiulsulfoxid, păstrată la 4°C ;
4. Soluția de stopare se prepară astfel : în 120 ml NaOH 0,5 M s-au dizolvat 3,57 g acid p-cloromercuribenzoic, 18,6 g EDTA Na_2 și s-a adus cu apă distilată la un volum de aproximativ 950 ml ; după ajustarea pH la valoarea 6,0 se aduce la 1 000 ml ;
5. Soluție de Fast Garnet GBC, preparată într-o soluție 4% de Brij 35 (greutate/volum), filtrată și utilizată proaspăt.
6. Reactivul de cuplare, folosit într-un interval de 30 minute, se prepară din volume egale de soluții 4 și 5 ;

7. Soluție standard de 2-naftilamină 200 μM (se dizolvă 3,49 mg 2-naftilamină. HCl în 1 ml etanol și se aduce la 100 ml cu apă distilată — reactiv ținut la 4°C într-o sticlă brună);

8. Soluție albumină serică bovină 0,01%;

9. Extract lizozomal. (Ficatul prelevat de la șobolan a fost spălat cu soluție de zaharoză 0,25 M pentru îndepărtarea sîngelui, omogenizat cu o soluție de zaharoză 0,25 M — 1 g cu 8 ml — iar pH a fost ajustat la valoarea 7,2; urmează o centrifugare timp de 10 minute la 2 500 r.p.m., sedimentul este reluat cu un volum de soluție, și centrifugat din nou. Supernatantele reunite au fost centrifugate 10 minute la 5 000 r.p.m. Supernatantele obținute au fost apoi recentrifugate la 14 000 r.p.m., timp de 60 minute. Sedimentele rezultate au fost resuspendate în tampon Tris 0,005 M-H_3PO_4 pH 7,8, înghețate/dezghețate și centrifugate 10 minute la 5 000 r.p.m., cînd supernatantul obținut a fost considerat extract lizozomal).

Modul de lucru. La 0,2 ml extract lizozomal s-au adăugat 0,1 ml soluței de albumină serică bovină 0,01% pentru a minimaliza pierderea activtiății datorate adsorbției la suprafață și 1,7 ml soluție tampon 2. După 5 minute preincubare la 40°C se adaugă 0,05 ml soluție substrat 3 și amestecul este agitat energic. După 10 minute incubare la 40°C se adaugă 2 ml reactiv 6 și se agită. Culoarea roșie se dezvoltă în decursul a 10 minute, după care se măsoară extincția la 520 nm față de apă.

Pentru fiecare probă se realizează și un martor în care reacția enzimatică a fost stopată la timpul zero. De asemenea, se măsoară densitatea optică la 520 nm.

Construirea curbei etalon. Soluția 7 de 2-naftilamină are o concentrație de 200 nmoli/ml.

Din aceasta se realizează diluții după cum urmează:

ml soluție	ml apă distilată	nmoli naftilamină în mediu
0,1	1,95	20
0,2	1,85	40
0,3	1,75	60
0,4	1,65	80
0,5	1,55	100
0,6	1,45	120
0,7	1,35	140
0,8	1,25	160

În fiecare eprubetă se adaugă cîte 2 ml reactiv 6 și se agită. Complexul roșu format este colorimetrat la 520 nm, după 10 minute. Se construiește o curbă etalon, indicînd pe abscisă nmoli naftilamină, iar pe ordonată $D.O._{520\ nm}$

Calculul rezultatelor. Densitățile optice măsurate pentru probe și martori sînt transformate în nmoli nafilamină cu ajutorul curbei etalon.

O unitate de activitate catepsinică a fost definită ca acea cantitate de enzimă care eliberează un nmol 2-naftilamină per minut. Deci:

$$U/ml = nmoli_{proba} - nmoli_{martor}$$

6.20. DOZAREA ACTIVITĂȚII TRIPSINEI

Tripsina este o endopeptidază care catalizează hidroliza legăturilor peptidice din proteine parțial hidrolizate, spre deosebire de pepsină care realizează „primul atac" asupra proteinelor alimentare în cursul procesului de digestie. Proteinele vor fi atacate de tripsină numai după o denaturare prealabilă cu uree sau prin tratament termic. Produșii reacției enzimatice catalizate de tripsină sînt polipeptide, oligopeptide și aminoacizi.

Această enzimă catalizează hidroliza legăturilor peptidice în care sînt implicate grupările carboxil a restului lizil sau arginil. Amidele și esterii acestor aminoacizi sînt de asemenea, hidrolizați, reactivitatea crescînd în ordinea : peptide — amide — esteri.

Activitatea tripsinei poate fi detectată și pe substrate sintetice ca : benzoil-L-argininamida, hipuril-L-argininamida, benzoil/hipuril-L-lizinamida, esterul eitilic al benzoil argininei etc.

Tripsina are un pH optim de 7,5. În mediul ei de reacție trebuie să existe $CaCl_2$ pentru a preveni formarea unor proteine inerte catalitic cînd zimogenul este transformat în enzimă activă.

Această endopeptidază se formează dintr-un precursor inactiv (masa moleculară a tripsinogenului din pancreasul bovin — 24 433) în celulele exocrine ale pancreasului și este secretat în lumenul intenstinului. Proenzima este transformată în enzimă activă sub acțiunea enterokinazei și autocatalitic. pH optim al procesului de activare este cuprins între pH 7 și 9 în cazul tripsinogenului bovin. În timpul procesului de activare (care constă din scindarea unei hexapeptide din structura tripsinogenului) este formată și o proteină inertă care la ultracentrifugare sedimentează mai lent decît tripsina — considerată a fi un polimer al enzimei monomere. Formarea proteinei inerte catalitic este inhibată de ionii de Ca^{2+} care previn agregarea moleculei de tripsină.

Tripsina nu poate fi detectată în ser datorită prezenței inhibitorilor naturali ai acestei enzime.

Experiența 94. DOZAREA ACTIVITĂȚII TRIPSINEI UTILIZÎND CA SUBSTRAT HEMOGLOBINA DENATURATĂ

Principiul metodei. Hemoglobina este denaturată chimic cu o soluție alcalină de uree. Tripsina hidrolizează compușii din proteina denaturată, formînd produși de reacție, solubili în acid tricloracetic, al căror conținut în tirozină și triptofan poate fi determinat cu reactivul Folin-Ciocâlteu la pH 11, sau spectrofotometric la 280 nm.

Reacivi și soluții

1. Soluția substrat. Se dizolvă 2 g hemoglobină, 36 g uree și 8 ml NaOH în 80 ml apă distilată. După 60 minute de staționare la temperatura camerei (pentru desăvîrșirea procesului de denaturarea hemoglobinei) se adaugă 10 ml soluție acid boric 1M (se dizolvă 6,184 g acid boric, 0,292 g NaCl în 100 ml apă distilată) și 4,4 ml $CaCl_2$ soluție 5%. pH soluției se aujstează la valoarea 7,5 cu HCl 1 N și se aduce la 100 ml.
2. Soluție NaOH 0,5 N ;
3. Soluție acid tricloracetic 5% ;

4. Reactiv Folin-Ciocâlteu diluat 1 : 2 (v. Experiența 92);

5. Soluție tripsină, obținută prin dizolvarea a 50 mg în 100 ml HCl 0,01 N, sau extract proteic total obținut din pancreas bovin, raportat de extracție 1/30 (greutate/volum).

Modul de lucru. Amestecul de reacție constă din:

1 ml soluție substrat 1;
0,2 soluție tripsină 5;

se incubează 10 minute la 35,5°C. Reacția enzimatică este stopată cu 2 ml soluție acid tricloracetic 3;

Probele se filtrează, după care se realizează reacția de colorare: 1 ml filtrat; 2 ml soluție NaOH 0,5 N; 0,6 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat de trei ori.

După 10 miunte, se determină densitatea optică la 660 nm, față de apă distilată. Pentru fiecare probă se prepară un martor, în care acidul tricloracetic este adăugat în mediu înaintea soluției de enzimă.

Calculul rezultatelor. Se realizează o curbă etalon, ca în modul descris la Experiența 92. Valorile densităților optice determinate pentru probe și martori sînt transformate în nmoli tirozină cu ajutorul acestei curbe etalon. Activitatea enzimatică se calculează cu ajutorul formulei:

$$\frac{(\text{nmoli}_{\text{proba}} - \text{nmoli}_{\text{martor}}}{10} \cdot 5 \cdot \frac{1}{3{,}2}$$

fiind exprimată în nmoli tirozină eliberați/1 ml enzimă/min/35,5°C. Semnificația coeficienților de transformare, incluși în formula de calcul a activității, este aceeași ca la Experiența 92.

După Anson, o unitate de tripsină este definită ca acea cantitate de enzimă, care în condiții standard hidrolizează hemoglobina cu o viteză inițială încît cantitatea produșilor de hidroliză formați într-un minut are aceeași densitate optică ca 1 nmol de tirozină.

Observație. Ca și în cazul pepsinei, determinarea vitezelor inițiale de reacție necesită construirea unei curbe Anson, a variației vitezei de reacție exprimată în nmoli Tyr/ml/min/35,5°C — cu concentrația unui preparat purificat de tripsină.

Din soluția 5, se realizează diluții: 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 și 1 : 5 cu HCl 0,001 N, a căror activitate catalitică se testează ca în modul indicat anterior. Rezultaele experimentale se prelucrează și se trasează curba Anson în care permite determinarea activității triptice a oricărui preparat — în unități Anson U^{Hb}.

6.21. DOZAREA ACTIVITĂȚII ARGINAZEI

Arginaza este o enzimă care catalizează hidroliza argininei, cu formare de ornitină și uree, fiind implicată în ciclul ureogenetic.

Enzima a fost intens studiată în țesuturi animale — atît în ficat unde există ciclul ureogenetic, cît și în alte organe: hepatopancreas, creier, rinichi etc. O atenție particulară a fost acordată studiului comparativ

al arginazelor izolate de la animalele uricotelice și ureotelice, cercetări care au dovedit că preparatele enzimatice izolate de la cele două categorii de animale diferă prin specificitățile lor față de substrate, prin masele moleculare, valorile constantelor cinetice K_M etc. Arginaza este o enzimă puternic activată de ioni bivalenți : Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} etc.

Experiența 95. DOZAREA ACTIVITĂȚII ARGINAZEI PRIN METODA LUI EGGLETON ȘI COLAB.

Principiul metodei. Guanidinele mono- și disubstituite dau, în mediu alcalin, complexe colorate în urma reacției cu α-naftol și diacetil. În mediu de n-propanol și în prezența unui exces de α-naftol, se poate realiza dozarea argininei în concentrații variind de la 10 la 100 μg.

Reactivi și soluții

1. *n*-propanol ;

2. Soluție de α-naftol 25%, preparată în *n*-propanol (se păstrează la —20°C) ;

3. Soluția de diacetil. La 1 g de dimetilglioximă dizolvată în 100 ml apă distilată se adaugă 20 ml acid sulfuric conc. Soluția rezultată se distilă, colectîndu-se aproximativ 50 ml. Se recomandă folosirea unei soluții de diacetil proaspăt distilată, deoarece în timp apar reacții de polimerizare ;

4. Soluția de developare se obține prin amestecarea a 20 ml soluție 2 cu 2,5 soluție 3, adusă la un volum final de 100 ml cu n-propanol ;

5. Soluție tampon glicină-NaOH pH 9,0 ;

6. Soluție arginină 0,05% preparată în tampon 5 ;

7. Soluție NaOH 3 M ;

8. Preparat proteic cu activitate arginazică (1 g hepatopancreas de la *Helix pomatia* este triturat cu 50 ml apă distilată, omogenatul este centrifugat la 6 000 t.p.m., 15 minute ; se păstrează supernatantul).

Modul de lucru. Amestecul de reacție care constă din :

1,2 ml soluție arginină 0,05% ;
1,6 soluție tampon glicină-NaOH pH 9,0
0,1 ml soluție $MnCl_2$ 0,25%
0,1 ml preparat enzimatic

este incubat la 37°C timp de 10 minute. Reacția enzimatică este stopată cu 0,1 ml soluție acid tricloracetic 50%. Pentru dezvoltarea reacției de culoare, se adaugă

1 ml soluție NaOH 3 M
2 ml soluție de developare

iar după 30 minute se citește densitatea optică la 535 nm.

Pentru fiecare probă se efectuează și un martor, în care se dozează concentrația de arginină introdusă inițial (timpul 0 al reacției) în mediu. Martorul prezintă aceleași componente ca proba, dar acidul tricloracetic este introdus în mediu înaintea enzimei.

Construirea curbei etalon. Soluția de arginină 0,05% (500 μg/ml) se diluează de 10 ori pentru a obține o concentrație de 50 μg/ml. Din soluția diluată de arginină se realizează alte noi diluții, la un volum final de 3 ml, după cum urmează :

ml soluție arginină (50 μg/ml)	ml soluție tampon 5	μg arginină
0,1	2,9	5
0,5	2,5	25
1,0	2,0	50
1,5	1,5	75
2,0	1,0	100

În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml NaOH 3 M și 2 ml soluție de developare, iar după 30 minute se citește densitatea optică la 535 nm față de apă. Se construiește o curbă etalon, indicînd pe abscisă concentrația în arginină, iar pe ordonată $D.O._{535\,nm}$

Calculul rezultatelor. Densitățile optice măsurate pentru probe și martori sînt transformate în μg arginină cu ajutorul curbei etalon, iar activitatea enzimatică — exprimată în μg arginină transformate de 1 ml preparat enzimatic/minut/37°C se calculează din formula :

$$\mu g\ \text{arginină}_{\text{martor}} - \mu g\ \text{arginină}_{\text{proba}}$$

6.22. DOZAREA ACTIVITĂȚII INVERTAZEI

Invertaza este o enzimă care catalizează reacția de hidroliză generală :

un β-D-fructofuranozid + H_2O ⟶ un alcool + D-fructoza

și în particular reacția :

$$\text{zaharoza} + H_2O \longrightarrow \underbrace{\text{glucoză} + \text{fructoză}}_{\text{zahăr invertit}}$$

Enzima izolată din droidie este o glicoproteidă cu 50% zaharuri, cu o masă moleculară de 270 000, un pH optim de 5,4 și un K_M de $9{,}1 \times 10^{-3}$ M.

Experiența 96. DOZAREA ACTIVITĂȚII INVERTAZEI

Principiul metodei. Zahărul invert (un amestec echimolecular de glucoză și fructoză) rezultat în urma hidrolizei enzimatice a zaharozei este dozat cu reactiv dinitrosalicilic.

Recativi și soluții

1. Reactiv dinitrosalicilic (v. Experiența 85) ;
2. Soluție zaharoză 0,25 M (preparată în tampon 4) ;
3. Soluție zahăr invertit 0,0025 M (0,0025 M glucoză, 0,0025 M fructoza) ;
4. Soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,02 M, pH 4,5 ;

5. Preparat proteic cu activitate invertazică (1 g hepatopancreas de la *Helix pomatia* este triturat cu 20 ml apă, extracției o oră la 4°C, se păstrează supernatantul după centrifugare la 6 000 t.p.m., 15 minute).

Modul de lucru. Mediul de reacție :

1 ml soluție zaharoză preparată în tampon 4 ;
1 ml preparat enzimatic

se incubează la 37°C timp de 15 minute, după care procesul enzimatic este stopat prin adăugarea de 2 ml reactiv dinitrosalicilic și fierbere 5 minute pe baie de apă. După răcirea probelor, amestecul se diluează la 10 ml și se colorimetrează la 540 nm față de apă. Pentru fiecare probă se execută și un martor, în care reacția enzimatică este stopată la timpul zero prin introducerea reactivului dinitrosalicilic înaintea preparatului enzimatic.

Construirea curbei etalon. În 10 eprubete se pipetează :

ml zahăr invert	ml apă	nmoli zahăr invert
0	1,0	0
0,1	0,9	250
0,2	0,8	500
0,3	0,7	750
0,4	0,6	1000
1,0	0	2500

și

1 ml soluție zaharoză (2)
2 ml reactiv dinitrosalicilic (1)

Probele sînt incubate 5 minute pe o baie de apă în fierbere. După răcire, se aduc la un volum final de 10 ml și se colorimetrează față de apă la 540 nm. Se trasează o curbă etalon indicînd pe abscisă nmoli zahăr invert și pe ordonată $D.O._{540\,nm}$.

Calcularea rezultatelor. Densitățile optice determinate pentru martor și probă sînt transformate în nmoli zahăr invertit cu ajutorul curbei etalon. Activitatea enzimatică exprimaă în nmoli zahăr inver format/ ml enzimă/1 minut/37°C se calculează folosind formula :

$$(\text{nmoli zahăr invert}_{\text{proba}} - \text{nmoli zahăr invert}_{\text{martor}}) \cdot \frac{1}{15}$$

Observație : Se va studia modul în care variază viteza procesului enzimatic cu creșterea temperaturii de incubare cu 10°C. Se vor face determinări la 30°C — 40°C — 50°C și 60°C. Se vor discuta rezultatele experimentale obținute.

6.23. DOZAREA ACTIVITĂȚII UREAZEI

Ureaza este o hidrolază (urea amidohidrolaza EC 3.5.1.5) care catalizează reacția de scindare hidrolitică a ureei :

$$\text{uree} + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2\,NH_3$$

Enzima izolată din *Canavalia ensiformis* are o masă moleculară de 483 000, fiind specifică pentru uree. În tampon fosfat, la pH 7 și la 25°C, ureaza din această sursă biologică are un K_M de $1{,}05 \times 10^{-2}$M. Este inhibată necompetitiv de Na^+, K^+ și NH_4^+ și competitiv de tiouree și suramină. Este activată de fosfați.

Experiența 97. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII UREAZEI CU REACTIV NESSLER

Principiul metodei. Amoniacul eliberat în urma acțiunii ureazei este dozat cu reactiv Nessler :

$$NH_2{-}CO{-}NH_2 + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2\,NH_3$$

$$2\,K_2HgI_4 + 3\,KOH + NH_3 \rightarrow O\begin{matrix} Hg \\ \diagup \quad \diagdown \\ Hg \end{matrix}NH_2I^- + 7\,KI + 2\,H_2O$$

Complexul colorat în galben-portocaliu, a cărui intensitate este proporțională cu concentrația de amoniac, este colorimetrat la 436 nm.

Reactivi și soluții

1. Reactiv Nessler : 50 g $HgCl_2$ + 25 g KI se dizolvă în 350 ml apă distilată. Se adaugă 100 g NaOH, se dizolvă și se aduce la volum final de 500 ml.
2. Soluție tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (0,6 g Tris se dizolvă în 60 ml apă distilată, se adaugă 29 ml HCl 0,1 N și se aduce la volum final de 100 ml).
3. Soluție uree 60 mM (360 mg%) preparată în tampon 2.
4. Soluție 10% de acid tricloracetic.
5. Preparat proteic cu activitate ureazică (1 g făină de soia cu 20 ml apă distilată).

Modul de lucru

Mediul de reacție care constă din :

4,0 ml soluție tampon
0,5 ml soluție uree (30 μmoli)
0,5 ml preparat enzimatic

se incubează 20 minute la 37°C, după care reacția este stopată prin pipetarea a 1 ml soluție 10% de acid tricloracetic. Amestecul se filtrează, iar 3 ml filtrat se tratează cu 0,5 ml reactiv Nessler și se colorimetrează la 436 nm. Concomitent se realizează și un martor în care reacția este stopată la timpul zero.

Densitatățile optice se transformă în termeni de concentrație în amoniac cu ajutorul unei curbe etalon.

Construirea curbei etalon

Se prepară o soluție de sulfat de amoniu 45 mg% în acid sulfuric 0,2 N, care se diluează de 10 ori înaintea folosirii. Din soluția diluată se prepară soluții etalon după cum urmează :

ml soluție $(NH_4)_2SO_4$ 4,5 mg %	ml apă distilată	μmoli NH_3 în probă
0,0	3,0	0
0,2	2,8	0,14
0,4	2,6	0,28
0,6	2,4	0,42
0,8	2,2	0,56
1,0	2,0	0,70

Se adaugă 0,5 ml reactiv Nessler și se colorimetrează la 436 nm. Se construiește o curbă etalon, indicînd pe abscisă concentrația în amoniac și pe ordonată densitatea optică la 436 nm.

Calculul rezultatelor

(μmoli NH_3 probă — μmoli NH_3 martor) × 2 × 1/20 — μmoli NH_3 eliberat/1 ml preparat enzimatic/min/37°C.

6.24. DOZAREA ACTIVITĂȚII COLINESTERAZELOR

Sub termenul de „colinesteraze" sînt incluse următoarele enzime care catalizează reacțiile :

Denumirea științifică	Denumirea de lucru	EC	Reacția catalizată
Acetilcolinhidrolaza	Acetilcolinesteraza	3.1.1.7	Acetilcolina + H_2O → Colina + Acid acetic
Acilcolin acilhidrolaza	Colin esteraza	3.1.1.8	Acilcolina + H_2O → Colina + Acid
	Benzoilcolin esteraza		Benzoilcolina + H_2O → Colina + Acid benzoic

Acetilcolinesteraza se găsește în creier, în celulele nervoase, în mușchi, în plămîni și în eritrocite. Situsul sintezei acetilcolinesterazei este ficatul, de unde este transportată la diferite organe prin intermediul sîngelui. Principalul rol al enzimei este cel de a hidroliza acetilcolina — mediator al transmiterii influxului nervos.

Există diferite metode de dozare a activității acestor enzime : metode manometrice, metode electrometrice bazate pe modificarea pH mediului de reacție și metode spectrofotometrice.

Experiența 98. DOZAREA ACTIVITĂȚII ACETILCOLINESTERAZEI

În cadrul metodei spectrofotometrice, concentrația de acetilcolină rămasă nehidrolizată este determinată în urma reacției cu hidroxilamina, iar acidul acetilhidroxamic format dă cu Fe^{3+} un hidroxamat feric, colorimetrabil la 520 nm.

Reactivi și soluții

1. Soluție de $NH_2OH.HCl$ 7,5% preparată în NaOH 2 N.
2. Soluție de $FeCl_3$ 5% preparată în HCl 1 N.
3. Soluție de acid tricloracetic 20%.
4. Soluție tampon fosfat sodic 0,1 M, pH 7,4.
5. Soluție substrat acetilcolină. HCl 0,1% preparată în tampon fosfat pH 7,4.
6. Extract hepatic (1 g cu 10 ml NaCl 0,9%).

Modul de lucru

Amestecul de reacție constituit din :
1 ml soluție substrat
1 ml extract hepatic

se incubează la 37°C timp de 30 minute, după care se adaugă :

1 ml soluție hidroxilamină, staționare 5 minute
2 ml soluție $FeCl_3$
1 ml soluție acid tricloracetic

se aduce la un volum final de 10 ml, se filtrează și se colorimetrează la 520 nm față de un blanc, preparat din 2 ml $FeCl_3$ 5% și 8 ml apă distilată.

Pentru fiecare probă se prepaă și un martor, în care activitatea enzimatică este stopată la timpul zero.

Densitățile optice sînt transformate în concentrații cu ajutorul unei curbe etalon.

Construirea curbei etalon

Dintr-o soluție stoc de acetilcolină.HCl 100 mg/ml se prepară diluții după cum urmează :

Proba nr.	1	2	3	4	5	6
ml soluție acetilcolină	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml apă dist.	1,9	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0
mg acetilcolină	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

În fiecare probă se adaugă 1 ml soluție hidroxilamină, se agită energic, iar după 5 minute se adaugă 2 ml soluție $FeCl_3$ și 1 ml soluție acid tricloracetic. Volumul se aduce la 10 ml cu apă distilată și după ce se agită conținutul, probele se colorimetrează față de același blanc ca și în cazul dozării activității enzimatice.

Se construiește o curbă etalon, indicînd pe ordonată absorbția la 520 nm, iar pe abscisă mg/2 ml acetilcolină.

Calculul rezultatelor se realizează utilizînd relația :

$$\frac{(\text{mg acetilcolină}_{\text{martor}} - \text{mg acetilcolină}_{\text{proba}}) \times 1000}{M \times 30} =$$

$$= \mu\text{moli acetilcolină hidrolizată/ml/min/37°C}$$

unde M — este masa moleculară a preparatului de acetilcolină.

Dacă întreaga cantitate de acetilcolină din mediu a fost hidrolizată de enzimă, se diluează preparatul proteic, iar în calculul rezultatelor se ține seama de factorul de diluție.

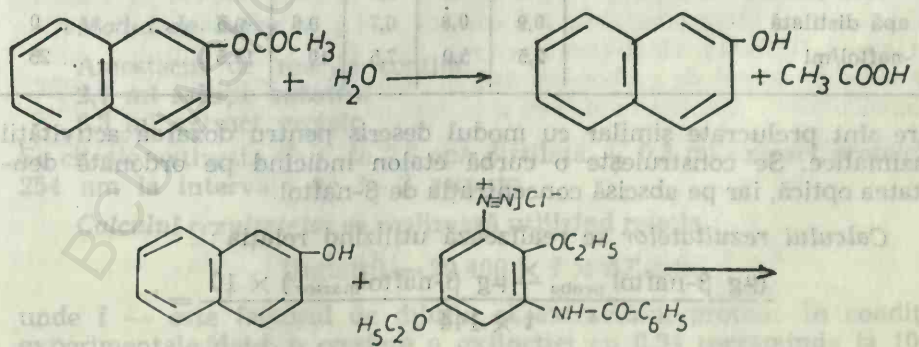
6.25. DOZAREA ACTIVITĂȚII ARILESTERAZELOR

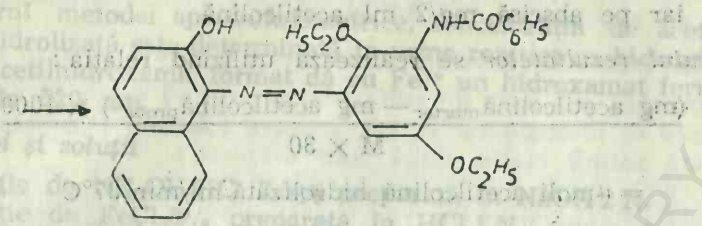
Arilesterazele catalizează hidroliza esterilor aromatici ai acizilor grași cu catenă scurtă. În serul uman există două arilesteraze : I — care migrează electroforetic în zona albuminelor și II — care migrează între zonele albuminelor și α_1-globulinelor. Arilesteraza I utilizează preferențial β-naftil propionatul și fenilacetatul ca substrate și nu este inhibată de esterii acidului fosforic. Arilesteraza II este puțin specifică și este inhibată de fosfoesteri. Se pare că arilesteraza I este implicată în metabolismul acizilor grași.

Substratele specifice pentru arilesteraza din serul uman sînt lipoproteinele în care resturi de tirozină sînt esterificate cu acizi grași cu catenă scurtă. Arilesterazele catalizează în ficat un transfer al acizilor grași liberi cu catenă lungă, care iau naștere din hidroliza lipoproteinelor din ser, spre inimă și plămîni.

Experiența 99. EVIDENȚIEREA ȘI DOZAREA ACTIVITĂȚII ARILESTERAZEI DIN BILĂ

Principiul metodei. Arilesteraza hidrolizează β-naftil acetatul, iar β-naftolul eliberat este cuplat cu o sare de diazoniu, formînd un azocolorant :





Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,4
2. Soluție β-naftil acetat (10 mg %) (se dizolvă în cîțiva mililitri de acetonă, apoi se aduce la semn cu tampon 1).
3. Soluție Fast-Blue 1 mg/2 ml
4. Acid acetic glacial
5. Soluție β-naftol 25 μg/ml.

Modul de lucru

Se incubează timp de 0, 5, 10, 15, 20 și 30 minute, la 37°C, probe care conțin următorul amestec de reacție:

1 ml soluție β-naftil acetat

0,1 ml bilă

după care se adaugă 1 ml soluție Fast Blue B (500 μg) și se incubează 5 minute la 37°C. Procesul de cuplare este stopat prin adăugarea a 2 ml acid acetic glacial.

Probele se colorimetrează la 546 nm față de apă distilată. Densitățile optice se transformă în concentrații cu ajutorul unei curbe etalon.

Construirea curbei etalon

Din soluția de β-naftol (25 μg/ml) se realizează diluții după cum urmează:

ml soluție β-naftol	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5 1,0
ml apă distilată	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5 0
μg -naftol/ml	2,5	5,0	7,5	10	12,5 25

care sînt prelucrate similar cu modul descris pentru dozarea activității enzimatice. Se construiește o curbă etalon indicînd pe ordonată densitatea optică, iar pe abscisă concentrația de β-naftol.

Calculul rezultatelor se realizează utilizînd relația:

$$\frac{(\mu g\ \beta\text{-naftol}_{proba} - \mu g\ \beta\text{-naftol}_{martor}) \times 10}{t \times 144} =$$

$$= \mu moli\ \beta\text{-naftol eliberat/min/ml/37°C}$$

în care t — este timpul de incubare (minute)

144 — masa moleculară a β-naftolului

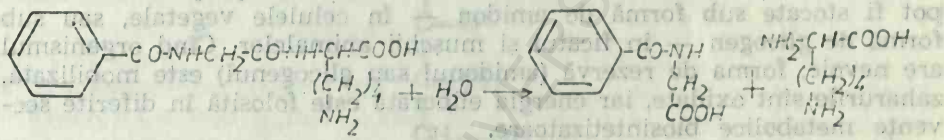
iar martorul — reprezintă proba cu 0 minute de incubare.

6.26. DOZAREA ACTIVITĂȚII CARBOXIPEPTIDAZELOR

Carboxipeptidazele hidrolizează peptide cu o grupare carboxil liberă, scindînd aminoacidul de la această extremitate. Carboxipeptidaza B este biosintetizată în pancreas sub forma unui zimogen și scindează preferențial aminoacizii bazici de la extremitatea C-terminală a substratului proteic sau peptidic. Carboxipeptidaza A acționează similar, dar nu prezintă specificitate față de un tip de rest de aminoacid.

Experiența 100. DOZAREA CARBOXIPEPTIDAZEI B CU HIPURIL-L-ARGININĂ CA SUBSTRAT

Principiul metodei. Acidul hipuric (N-benzoil-glicina)



N-benzoil-glicin-L-arginina — *N-benzoil-glicina* — *Arginina*

format din hidroliza enzimatică a N-benzoil-glicil-L-argininei are o absorbție la 254 nm mai mare decît peptida substrat, ceea ce permite urmărirea activtății carboxilpeptidazei.

Reactivi și soluții

1. Soluție tampon Tris-HCl pH 7,8 (0,33 g Tris și 0,64 g NaCl se dizolvă în 25 ml apă distilată, se adaugă 22,5 ml HCl 0,1 N și se diluează la 100 ml).

2. Soluție hipudil-L-arginină (1,1 mM). Se dizolvă 39 mg hipuril-L-arginină în 100 ml soluție tampon Tris-HCl-NaCl.

3. Extract hepatic, pancreatic, suc duodenal.

Modul de lucru

Amestecul de reacție conține :

2,7 ml soluție substrat

0,3 ml extract proteic

Se citește extincția (față de 2,7 apă distilată + 0,3 ml extract proteic) la 254 nm la intervale de 1—2 minute.

Calculul rezultatelor se realizează utliizînd relația :

$$\text{Unități/l} = 29\,400 \times f \times \Delta E/\text{min}$$

unde f — este factorul de diluție al extractului proteic. În condițiile experimentale date, o creștere a extincției cu 0,34 corespunde la 100% hidroliză a substratului.

CAPITOLUL VII

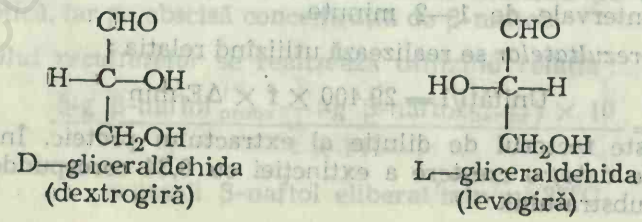
ZAHARURI

Zaharurile sînt biomolecule deosebit de importante pentru metabolismul organismelor vii. Ele sînt biosintetizate de organismele fotosintetizante (plante verzi, alge, unele bacterii) din bioxid de carbon și apă, utilizînd energia solară, cu ajutorul moleculelor fotoreceptor ale clorofilelor. Aproximativ 50% din greutatea uscată a plantelor o constituie zaharurile. Organismele heterotrofe, care se hrănesc cu plante, metabolizează zaharurile și le transformă în biomolecule proprii. Zaharurile pot fi stocate sub formă de amidon — în celulele vegetale, sau sub formă de glicogen — în ficatul și mușchii animalelor. Cînd organismul are nevoie, forma de rezervă (amidonul sau glicogenul) este mobilizată, zaharurile sînt oxidate, iar energia eliberată este folosită în diferite secvențe metabolice biosintetizatoare.

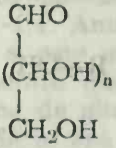
Pe lîngă funcția zaharurilor ca surse de energie, aceste biomolecule sînt componente ale capsulei bacteriilor, ale mucopolizaharidelor din piele și din țesutul conjunctiv al animalelor. De asemenea, fac parte din structura altor molecule de interes biochimic major : glicoproteine, glicolipide, acizi nucleici, coenzime etc.

Zaharurile pot fi împărțite în trei grupe principale : monozaharide, oligozaharide și polizaharide. Monozaharidele sînt zaharuri simple care nu mai pot fi hidrolizate în unități mai mici. Oligozaharidele sînt formate din 2—6 resturi de monozaharide, care pot fi eliberate prin hidroliză. Polizaharidele sînt compuși macromoleculari care prin hidroliză dau naștere la un număr mare de zaharuri simple.

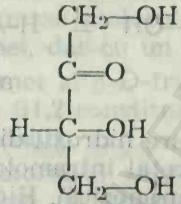
Monozaharidele sînt compuși polihidroxilici, care conțin o grupe funcțională aldehidică sau cetonică la primul sau la al doilea atom de carbon. Monozaharidele pot conține trei atomi de carbon (trioze), patru atomi (tetroze), cinci (pentoze) sau șase (hexoze). Conținînd unul sau mai mulți atomi de carbon asimetrici, zaharurile prezintă un număr de stereoizomeri. De exemplu, cea mai simplă aldotrioză — gliceraldehida, prezintă un singur atom de carbon asimetric și doi stereoizomeri D și L :



care se comportă ca un obiect și imaginea lui în oglindă. Literele D și L indică configurația absolută a penultimului atom de carbon. Cei doi izomeri rotesc planul luminii polarizate spre dreapta (dextrorotație) și respectiv spre stînga (levorotație) cu același unghi. Izomerii dextrogiri sînt notați prin litera *d* sau (+), cei levogiri prin *l* sau (—). Celelalte aldoze sînt derivate de la gliceraldehidă prin adiția de grupări —CH—OH, dînd naștere la două serii de stereoizomeri : D-zaharurile (de la D-gliceraldehidă) și L-zaharurile (de la L-gliceraldehidă). În seria geometrică D nu toți compușii sînt dextrogri, după cum în seria L, nu toți sînt levogiri.

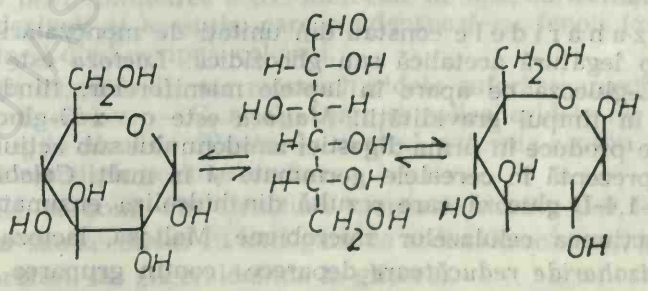


Pentru D-cetoze, compusul de bază este D-eritruloza, deoarece dihidroxiacetona nu este optic activă.



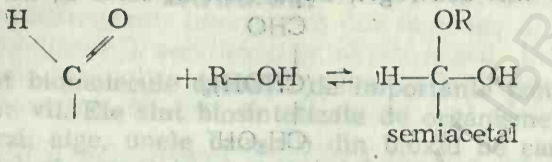
Majoritatea zaharurilor care apar în natură aparțin seriei geometrice D. Aldopentozele posedă trei atomi de carbon asimetrici și deci au opt stereozomeri : patru aparținînd serei D și patru seriei L. Aldohexozele posedă patru atomi de carbon asimetrici, deci cu 16 stereoizomeri. Cetohexozele avînd numai trei atomi de carbon asimetrici, posedă numai 8 izomeri sterici. Cele mai comune hexoze care apar natural sînt D-glucoza, D-manoza, D-galactoza și D-fructoza. Primele trei zaharuri sînt aldohexoze, ultimul este o cetohexoză.

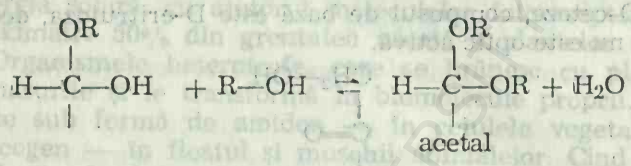
Cînd D (+)-glucoza este dizolvată în apă, se determină o rotație specifică de + 113°, care în decursul a 24 ore scade pînă se stabilizează la valoarea de +52,5°, fenomen numit *matarotație*, caracteristic unui număr de pentoze, hexoze și dizaharide reducătoare. Mutarotația glucozei este datorată faptului că această aldohexoză există în soluție sub forma unui echilibru între trei structuri :



α-D-glucoza (36%) | forma aciclică (0,02%) | β-D-glucoza (64%)

Anomerul α al D(+)-glozocei are o rotație specifică de + 113°. Forma β are o rotație de +19,7°. Cînd α-D(+)-glucoza este dizolvată în apă, soluția proaspătă prezintă rotația caracteristică acestui anomer. În timp are loc transformarea lui α în β iar la echilibru, cînd amestecul de reacție conține 64% β-D-glucoză și 36% α-D-glucoză, rotația devine +52,5°. Fenomenul de mutarotație este datorat grupării carbonil a zaharurilor care este foarte reactivă și formează semiacetali și acetali cu diferiți compuși hidroxilici :





Cînd reacția are loc cu o grupare hidroxil din propria structură (de la C_4 sau C_5) se formează un semiacetal intramolecular și deci o structură ciclică internă (piranozică sau furanozică). Hidroxilul care rămîne la C_1 — *hidroxilul glicozidic* — este deosebit de reactiv și formează ușor o legătură glicozidică cu alte grupări hidroxil prin eliminarea unei molecule de apă. Dacă reacția are loc cu un alt compus hidroxilic decît un zahar, se formează un *glicozid*; dacă reacția are loc cu un alt zahar se formează un *dizaharid*. Procesul poate fi repetat dînd naștere la oligozaharide și apoi la polizaharide.

Prin urmare glucoza există în soluție ca un amestec la echilibru între formele α și β, cu urme ale formei cu gruparea aldehidică liberă — care însă îi conferă proprietăți reducătoare. Ca și celelalte aldohexoze, glucoza există predominant în forma piranozică, care constituie un semiacetal al grupării C=O de la C_1 cu funcția hidroxil de la C_5. Cetohexozele și aldopentozele există în forma furanozică, un semicetal sau semiacetal constituit între gruparea carbonil de la C_2 și respectiv de la C_1 cu funcția hidroxil a penultimului atom de carbon.

Oligozaharidele constau din unități de monozaiaride condensate printr-o legătură acetalică sau glicozidică. *Lactoza* este o β-D-galactozil-1,4-L-glucoză ce apare în laptele mamiferelor, fiind prezentă și în urină în timpul gravidității. *Maltoza* este o α-D-glucozil-1,4-D-glucoză ce se produce în urma digestiei amidonnului sub acțiunea α-amilazei, fiind prezentă în cerealele germinate și în malț. *Celobioza* este o β-D-glucozil-1,4-D-glucoză care rezultă din hidroliza enzimatică a celulozei, sub acțiunea celulazelor microbiene. Maltoza, lactoza și celobioza sînt *dizaharide reducătoare* deoarece conțin gruparea aldehidică, potențial liberă. *Zaharoza,* care este o α-D-glucozil-β-1,1-D-fructoză și care se găsește în plante și fructe, este un dizaharid nereducător.

Polizaharidele sînt macromolecule care sînt constituite fie dintr-un singur tip de unitate monozaharidică care se repetă (homopolizaharide), fie din două sau mai multe unități de bază (heteropolizaharide). Homopolizaharidele pot avea fie un rol structural (celuloza, chitina), fie de stocare a energiei (amidon, glicogen, inulină).

Amidonul reprezintă sursa de energie și de zaharuri a plantelor. Este un produs de policondensare a glucozei, avînd o greutate moleculară care variază între 10 000 și 1 000 000. Componentul minor al amidonului, *amiloza*, are o masă moleculară de 10 000—20 000, fiind constituit din resturi de glucoză unite prin legături α-1,4. Amiloza este solubilă în apă caldă, dă cu iodul o coloratie albastră și este un homopolizaharid nereducător. *Amilopectina* reprezintă componentul major al amidonului (aproximativ 80%) și este constituit din catene de glucoză legate de α-1,4, înrețelate prin legături α-1,6. Este insolubilă în apă caldă și dă cu iodul o coloratie violetă—roșu.

Glicogenul este polizaharidul de rezervă a majorității mamiferelor, fiind un polimer al glucozei (masă moleculară 1 000 000—5 000 000) cu o structură similară amilopectinei, dar cu un grad de ramificare mai mare.

Inulina este un homopolimer al β-D-fructozei, în care unitățile repetitive sînt legate prin legături β1,2 constituind polizaharidul de rezervă a multor plante (anghinarie, dalii).

Componentul major structural al pereților celulari de la plante, de la alge și bacterii este *celuloza*, un homopolizaharid constituit din resturi de β-D-glucoză, unite prin legături β-1,4. *Chitina* este constituită dintr-o catenă lineară în care resturile de β-D-N-acetil glucozamină sînt unite prin legături β-1,4, fiind componentul principal al exoscheletului insectelor, crabilor și homarilor.

Proteoglicanii (mucoproteinele) sînt heteropolizaharide în care componenta polizaharidică predomină. Cînd componenta zaharidică este minoră, complexele se numesc *glicoproteine*.

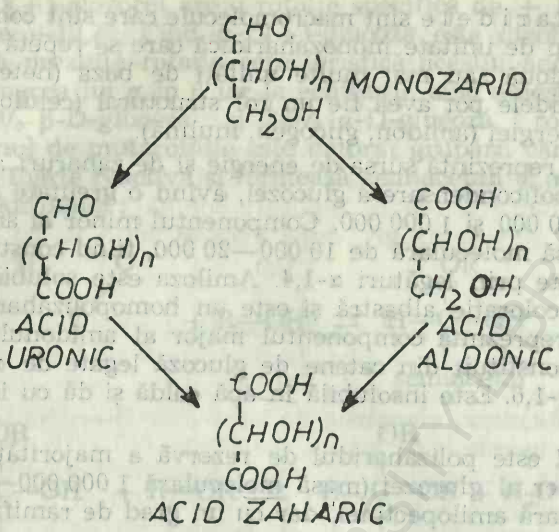
7.1. PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE ZAHARURILOR

Prin încălzire cu acid sulfuric concentrat, zaharurile sînt complet dezhidratate și carbonizate. În condiții mai blînde, zaharurile sînt parțial deshidratate prin eliminarea a trei molecule de apă, cu formare de furfural sau de derivați ai acestuia, care condensează cu fenoli (α-naftol, rezorcină, orcinol) dînd compuși coloranți.

În soluții alcaline diluate monozaharidele suferă rearanjări la nivelul atomilor de carbon — C_1 și C_2. Oligo și polizaharidele nu sînt hidrolizate de soluțiile alcaline diluate. În mediul puternic alcalin, monozaharidele suferă reacții de polimerizare.

Grupările carbonil din structura monozaharidelor pot fi reduse la alcool primar sau secundar cu amalgam de sodiu. Fructoza și glucoza sînt reduse la sorbitol, iar gliceraldehida la glicerol.

Grupările aldehidice și alcool primare a aldozelor pot fi oxidate la acizi aldonici și uronici. Continuînd oxidarea se obțin acizi zaharici :



Experiența 101. REACȚII DE IDENTIFICARE A ZAHARURILOR

a. Reacția Molisch

În prezența acidului sulfuric concentrat, poli- și oligo-zaharidele sînt hidrolizate la monozaharide, care sînt apoi deshidratate la furfural sau derivați ai furfuralului. Acești produși condensează cu α-naftolul dînd un complex purpuriu. Metoda reprezintă un test general pentru toate zaharurile, chiar pentru cele asociate cu proteine.

Reactivi și soluții

— acid sulfuric concentrat
— soluție de α-naftol 5%, preparată proaspăt în etanol
— soluții 0,1% de monozaharide, dizaharide, polizaharide

Modul de lucru

În eprubete cu cîte 2 ml soluții de testat se adaugă 0,5 ml soluție de α-naftol și se amestecă prin agitare. Apoi, cu grijă, prin prelingere pe pereții eprubetei se pipetează 1 ml acid sulfuric. La interfața dintre cele două straturi se observă formarea unui inel colorat în roșu.

b. Reacția cu antronă

Furfuralul sau derivații lui, rezultați în urma tratamentului zaharurilor cu acid sulfuric, condensează cu antrona (10-ceto-9, 10-dihidroantracen), dînd un complex de culoarea albastru-verde.

Reactivi și soluții

— soluție antronă 0,2% în acid sulfuric concentrat
— soluții 0,1% de monozaharide, dizaharide, polizaharide

Modul de lucru

În eprubete cu cîte 1 ml soluții de testat se adaugă cîte 2 ml reactiv cu antronă. Se amestecă și se urmărește modificarea culorii.

c. Reacția cu iodul

Iodul formează complexe colorate cu polizaharidele; amidonul dă cu iodul o coloratie albastră, glicogenul și amidonul parțial hidrolizat — colorații roșu-brune.

Reactivi și soluții

— soluție 0,005 M de iod
— soluție 1% de celuloză, inulină, glicogen și amidon
— soluție 1 M de HCl

Modul de lucru

În eprubete cu cîte 1 ml soluții de testat se adaugă acid clorhidric diluat pînă la acidifierea mediului, după care se adaugă cîte 1 ml soluție de iod. Se compară culorile complexelor formate cu iodul.

d. Reacția Benedict

Această metodă este utilizată pentru testarea zaharurilor reducătoare, care reduc ionii de Cu (II) la Cu (I), conducînd la formarea unui precipitat roșu de oxid cupros.

Reactivi și soluții

— Reactivul Benedict: se dizolvă 1,73 g citrat de sodiu și 10 g carbonat de sodiu în aproximativ 80 ml apă distilată caldă, soluția rezultată se filtrează și se aduce la un volum final de 85 ml cu apă distilată. Într-alt vas, se dizolvă 1,73 g sulfat de cupru în 15 ml apă. Cele două soluții se amestecă sub agitare.
— soluții 0,1% de glucoză, fructoză și zaharoză

Modul de lucru

În trei eprubete cu cîte 1 ml din soluțiile de testat se adaugă cîte 2 ml reactiv Benedict și se incubează timp de 5 minute pe o baie de apă la fierbere. Apariția unor precipitate verzi, galbene sau roșii indică prezența zaharurilor reducătoare.

Se examinează sensibilitatea reacției Benedict crescînd diluțiile soluțiile de glucoză.

e. Testul oglinzii de argint

Zaharurile reducătoare reduc ionii de Ag (I) dintr-o soluție amoniacală de azotat de argint la argint metalic, care se depune pe pereții eprubetei sub forma unei oglinzi.

Reactivi și soluții

— soluție 1% de $AgNO_3$
— soluție 30% de NH_4OH
— soluții 0,1% de glucoză, fructoză, lactoză și zaharoză

Modul de lucru

În mai multe eprubete se pipetează cîte 1 ml soluție de azotat de argint și se adaugă amoniac pînă cînd precipitatul format se redizolvă. Se adaugă cîte 1 ml din soluțiile de testat și se incubează, cu grijă (reactivul este exploziv !) pe o baie de apă la 70°C timp de 5 minute. Formarea unei oglinzi de argint indică prezența unui zahar reducător.

f. Reacția Barfoed

Această reacție face distincția între monozaharidele și dizaharidele reducătoare. Reactivul Barfoed fiind slab acid este redus numai de monozaharide, totuși fierberea prelungită poate conduce la hidroliza dizaharidelor.

Reactivi și soluții

— reactivul Barfoed : se dizolvă 1,33 g acetat de cupru în 20 ml apă distilată și se adaugă 0,2 ml acid acetic glacial.
— soluții 0,1% de glucoză, fructoză, lactoză, zaharoză

Modul de lucru

La 1 ml soluție de testat se adaugă 2 ml reactiv Barfoed și se incubează 1 minut pe o baie de apă la fierbere. În cazul reacției glucozei se observă oxidul cupros de culoare roșie.

g. Reacția Fearon

Această reacție permite identificarea dizaharidelor reducătoare.

Reactivi și soluții

— soluție apoasă 5% de clorhidrat de metilamină
— soluție 20% de NaOH
— soluție 0,1% de glucoză, manoză, lactoză

Modul de lucru

În trei eprubete se pipetează cîte 4 ml din soluțiile de testat, apoi se adaugă cîte 1 ml soluție de clorhidrat de metilamină. Eprubetele se incubează pe o baie de apă în fierbere, exact 30 s, se răcesc sub jet de apă, după care se pipetează cîte 1 ml soluție 20% de hidroxid de sodiu. În cazul dizaharidelor reducătoare apare o coloratie roșie.

s. Reacția Seliwanoff

Cetozele în prezența acidului clorhidric sînt deshidratate dînd derivați ai furfuralului, care condensează cu rezorcina dînd o substanță de culoare roșie.

Reactivi și soluții

— reactivul Seliwanoff : se dizolvă 50 mg rezorcină în HCl 3 M și se aduce la un volum final de 100 ml cu aceeași soluție de acid
— soluții 0,1% de fructoză, glucoză și zaharoză

Modul de lucru

În eprubete cu cîte 0,5 ml soluție de testat se adaugă 2 ml reactiv Seliwanoff și se incubează pe o baie de apă la fierbere exact un minut. În cazul cetozelor apar colorații roșu-închis.

i. Reacția Foulger

Această reacție reprezintă un test specific pentru ceto-zaharuri.

Reactivi și soluții

— reactiv Foulger : se dizolvă 40 g uree în 80 ml H_2SO_4 40% (v/v) și se adaugă 2 g $SnCl_2$. Se fierbe amestecul pînă se clarifică și se aduce la un volum final de 100 ml cu H_2SO_4 40%
— soluții 0,1% de glucoză, fructoză, zaharoză
— acid clorhidric concentrat

Modul de lucru

La 2 ml soluție de testat se adaugă 1 ml HCl conc. și 1 ml reactiv Foulger. Amestecul de reacție este incubat la fierbere timp de 2 minute Ceto-zaharurile se colorează în albastru.

j. Reacția Bial

Pentozele încălzite cu HCl concentrat sînt deshidratate cu formare de furfural, care condensează cu orcinolul, în prezența ionilor de Fe (III) cu formarea unor complexe colorate în albastru-verde. Prin încălzire prelungită, în aceleași condiții, hexozele dau reacții de culoare.

Reactivi și soluții

— reactiv Bial : se dizolvă 0,3 g orcinol în 100 ml HCl conc. și se adaugă 4 picături dintr-o soluție 10% de $FeCl_3$
— soluții 0,1% de glucoză, riboză, zaharoză

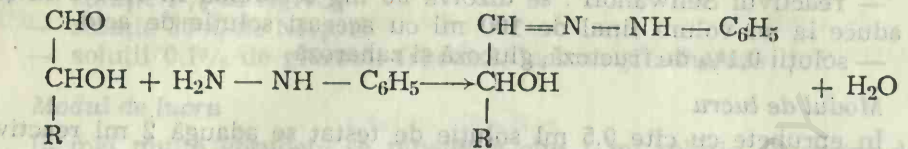
Modul de lucru

Se adaugă 1 ml soluție de testat la 3 ml reactiv Bial și se incubează la fierbere, 1 minut. Apariția unei culori verzi reprezintă o reacție pozitivă pentru pentoze și acizi uronici.

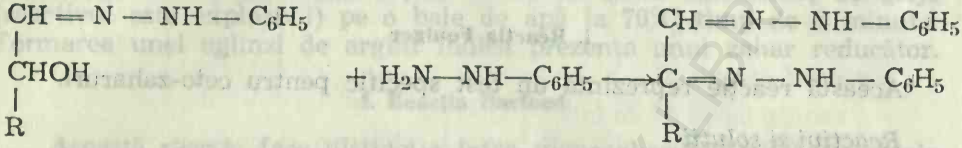
k. Formarea osazonelor

Zaharurile, conținînd grupări —CO—CHOH— formează osazone cu fenilhidrazină, care permit identificarea lor prin studiul microscopic al caracteristicilor spectrale a cristalelor și prin determinarea punctelor de topire. Tot în vederea identificării zaharului se notează timpul de formare a cristalelor și dacă osanoza este precipitată din soluție fierbinte sau numai prin răcire.

Fenilhidrazina reacționează cu gruparea carbonil a unui zahar reducător dînd fenilhidrazona :



care apoi reacționează cu încă o moleculă de fenilhidrazină, formînd osazone :



Mecanismul de reacție este mult mai complicat decît este prezentat aici. De asemenea, cetozele formează similar osazone.

Reactivi și soluții

— clorhidrat de fenilhidrazină
— acetat de sodiu
— acid acetic glacial
— soluții 0,1% a zaharurilor de testat

Modul de lucru

Într-o serie de eprubete se pun cîte 0,5 g clorhidrat de fenilhidrazină (sau 3 picături dintr-o soluție de fenilhidrazină), 1 g de acetat de sodiu, 0,5 ml acid acetic glacial și 3 ml soluție de testat. Amestecul de reacție se încălzește pe o baie de apă la fierbere, timp de 1 minut, pentru a dizolva substanțele solide și a favoriza reacția. Dacă soluțiile nu sînt clare, se filtrează. Se incubează probele pe o baie de apă la fierbere și la intervale de 5 minute se examinează dacă au apărut cristalele, notîndu-se eprubetele în care osazonele au cristalizat la cald. După 30 minute, se scot probele din baia de apă și se urmărește cristalizarea la temperatura camerii. Se studiază la microscop forma cristalelor. În tabelul următor vom prezenta condițiile experimentale de formare și identificare a osazonelor unor mono- și dihazaride :

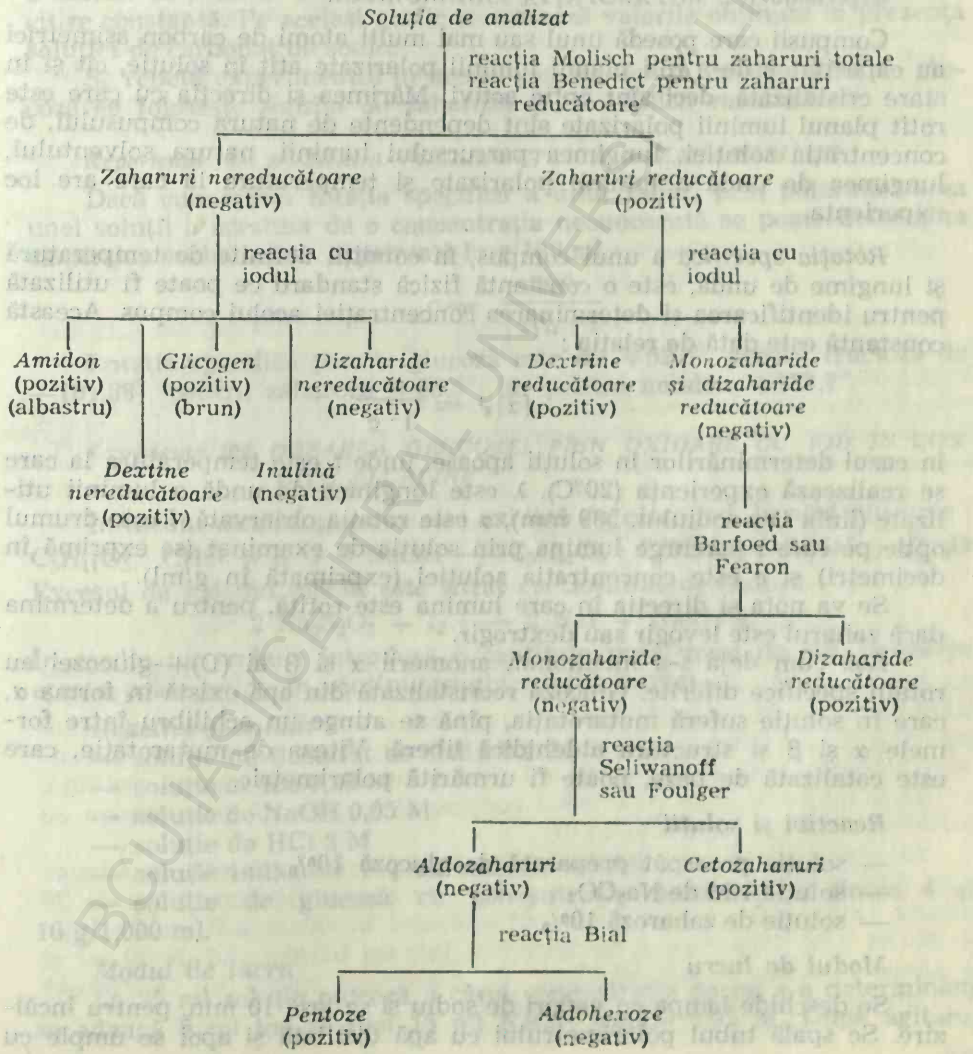
Zahăr	Timpul aproximativ de formare a osazonei (min)	punct de topire (°C)
Arabinoza	10	166
Fructoza	2	205
Galactoza	20	206
Glucoza	4	205
Lactoza	— solubilă în apă fierbinte	200 (se descompune)
Maltoza	— solubilă în apă fierbinte	208
Manoza	4 (cristale albe)	205
Zaharoza	— nu formează osazonă	
Xiloza	7	163

În continuare vom prezenta o schemă pentru identificarea unui zahar necunoscut. Se recomandă confirmarea zaharului prin prepararea unei osazone și prin măsurarea Rf în urma separării lui cromatografice.

7.2. METODE DE DOZARE A ZAHARURILOR

Metodele de dozare a zaharurilor se bazează pe proprietățile fizice sau chimice ale acestora. Există metode bazate pe proprietățile fizice: determinări polarimetrice, refractometrice, vîscozimetrice etc. Astfel, de exemplu, datorită faptului că activitatea optică a zaharurilor este dependentă de natura și de concentrația acestora în soluție, polarimetria reprezintă o metodă larg folosită de evidențiere și dozare a acestor biomolecule.

Proprietățile chimice care permit dozarea zaharurilor sînt:



BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

— proprietatea zaharurilor de a suferi reacții de deshidratare, sub acțiunea acizilor minerali concentrați, transformîndu-se în furfural sau derivați ai acestuia — care condensează cu amine aromatice sau fenoli, cu formarea unor substanțe colorate, colorimetrabile ;

— proprietatea zaharurilor de a se oxida sub acțiunea periodatului, cu ruperea legăturii C—C ;

— proprietatea zaharurilor reducătoare de a reduce, în mediu alcalin, ionii de Cu (II), de Fe (III) sau unele substanțe organice etc.

Cele mai specifice, sensibile și rapide metode de dozare a zaharurilor sînt dozările enzimatice, care utilizează preparate înalt purificate de glucozoxidază, peroxidază, catalază, galactozoxidază, galactoză dehidrogenază etc.

Experiența 102. MUTAROTAȚIA ZAHARURILOR

Compușii care posedă unul sau mai mulți atomi de carbon asimetrici au capacitatea de-a roti planul luminii polarizate atît în soluție, cît și în stare cristalizată, deci sînt optic activi. Mărimea și direcția cu care este rotit planul luminii polarizate sînt dependente de natura compusului, de concentrația soluției, lungimea parcursului luminii, natura solventului, lungimea de undă a luminii polarizate și temperatura la care are loc experiența.

Rotația specifică a unui compus, în condiții definite de temperatură și lungime de undă, este o constantă fizică standard ce poate fi utilizată pentru identificarea și determinarea concentrației acelui compus. Această constantă este dată de relația :

$$[\alpha]_\lambda^t = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

în cazul determinărilor în soluții apoase, unde t este temperatura la care se realizează experiența (20°C), λ este lungimea de undă a luminii utilizate (linia D a sodiului, 589 mm), α este rotația observată, l este drumul optic pe care-l parcurge lumina prin soluția de examinat (se exprimă în decimetri) și c este concentrația soluției (exprimată în g/ml).

Se va nota și direcția în care lumina este rotită, pentru a determina dacă zaharul este levogir sau dextrogir.

Așa cum deja s-a menționat, anomerii α și β ai (D)+-glucozei au rotații specifice diferite. Glucoza recristalizată din apă există în forma α, care în soluție suferă mutarotația, pînă se atinge un echilibru între formele α și β și structura aldehidică liberă. Viteza de mutarotație, care este catalizată de baze, poate fi urmărită polarimetric.

Reactivi și soluții

— soluție proaspăt preparată de glucoză 10%
— soluție 1 M de Na_2CO_3
— soluție de zaharoză 10%

Modul de lucru

Se deschide lampa cu vapori de sodiu și se lasă 10 min. pentru încălzire. Se spală tubul polarimetrului cu apă distilată și apoi se umple cu

BIBLIOTECA DE BIOLOGIE

apă în așa fel încît la închiderea lui să nu pătrundă bule de aer. Se rotește analizorul pînă cînd intensitatea luminii în cele două zone semicirculare este aceeași. Se notează citirea, care reprezintă punctul zero al instrumentului.

Se umple apoi tubul polarimetrului cu o soluție de glucoză 10%, proaspăt preparată și se determină rotația analizorului pînă cele două zone sînt la fel de întunecate — se notează citirea, care reprezintă timpul zero. Se notează rotația la fiecare 10 minute, în primele 30 minute și apoi la fiecare 20 minute pînă cînd se obține o citire constantă. Se trasează un grafic al variației rotației în timp.

Se prepară o altă soluție de glucoză 10%, la care se adaugă trei picături de Na_2CO_3 1 M și se amestecă prin agitare. Se umple tubul polarimetrului cu această soluție și se măsoară rotația analizorului la fiecare 2 minute în primele 10 minute, apoi la fiecare 5 minute pînă se obține o citire constantă. Pe același grafic se trasează valorile obținute în prezența soluției de carbonat de sodiu.

Se repetă experimentul în mediu alcalin, dar în locul soluției de glucoză se folosește soluția de zaharoză și se explică rezultatele.

Experiența 103. DOZAREA POLARIMETRICĂ A ZAHARURILOR

Dacă cunoaștem rotația specifică a unui zahar, prin polarimetrarea unei soluții a acestuia de o concentrația necunoscută se poate determina cantitatea acelui zahar exprimată în g/100 ml :

$$c = \frac{100}{[\alpha]_D^t \cdot l}$$

Rotația specifică pentru glucoză este de +52,6°, pentru fructoză de —101,38°, pentru zaharoză +66,5°, iar pentru amidon +183,7°.

Experiența 104. DOZAREA GLUCOZEI PRIN OXIDARE CU IOD ÎN CONDIȚII ALCALINE

În mediu alcalin, glucoza este oxidată de către iod, la acid gluconic : $C_5H_{11}O_5 \cdot CHO + I_2 + 3\ NaOH \longrightarrow C_5H_{11}O_5 \cdot COONa + 2\ NaI + 2H_2O$
Excesul de iod din mediu este titrat cu tiosulfat de sodiu :

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

În mediu nu trebuie introdusă o cantitate prea mare de iod, deoarece acesta poate oxida în continuare gluconatul format.

Reactivi și soluții

— soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 M
— soluție de iod 0,05 M
— soluție de NaOH 0,05 M
— soluție de HCl 2 M
— soluție indicator 1% de amidon solubil
— soluție de glucoză cu concentrație necunoscută (între 4 și 10 g/1 000 ml.

Modul de lucru

La 25 ml soluție glucoză a cărei concentrație dorim s-o determinăm se adaugă 5 ml iod și apoi 15 ml NaOH soluție 0,05 M. După agitare,

culoarea iodului dispare datorită formării iodurii. Se adaugă din nou 5 ml iod + 15 ml NaOH și se agită. Dacă culoarea a dispărut se repetă operația. Dacă apare colorația galbenă a hipoioditului de sodiu, înseamnă că în mediu există un exces de iod și se notează V_t — volumul total de iod adăugat. Se acidifică mediul cu HCl 2 M pînă la pH 5 (sub control, cu o hîrtie indicatoare de pH), iar excesul de iod este titrat cu tiosulfat de sodiu, în prezență de amidon 1%.

Calculul rezultatelor

La 2 moli tiosulfat corespunde 1 mol de iod, așa că volumul excesului de iod este dat de relația :

$$V_e = \frac{1}{2} \frac{\text{ml tiosulfat} \cdot \text{molaritate tiosulfat}}{\text{molaritate iod}} = \frac{1}{2} \frac{\text{ml tiosulfat} \cdot 0{,}1}{0{,}05}$$

Cantitatea de iod necesară pentru a oxida 25 ml soluție de glucoză = $(V_t - V_e) \cdot$ molaritate iod = $(V_t - V_e) \cdot 0{,}05$ = nmoli I_2.

Deoarece unui mol de iod îi corespunde un mol de glucoză, în cadrul reacției de oxidare, concentrația glucozei în proba de analizat, exprimată în g/1000 ml poate fi calculată utilizînd relația :

$$(V_t - V_e) \cdot 0{,}05 \cdot \frac{1000}{25} \cdot \frac{180}{1000}$$

Experiența 105. DETERMINAREA CONȚINUTULUI ÎN ZAHARURI DIN PORTOCALE

În această experiență, zaharurile din fruct sînt determinate titrimetric prin oxidare cu iod, în mediu alcalin. O parte din extract este apoi hidrolizat în mediu acid și conținutul în glucoză din zaharoza hidrolizată este determinat similar. Conținutul fructelor în proteine este foarte mic și deci nu este necesară deproteinizarea fructelor, înainte de determinarea propriu-zisă.

Soluții și materiale

— soluțiile de la experiența 16
— soluție de NaOH 2 M
— fructe (portocale)

Modul de lucru

Se descojește o portocală și se cîntăresc 50 g care se omogenizează în prezența a 50 ml apă cu ajutorul unui omogenizator cu cuțite. După o extracție de 10 minute, efectuată sub agitare ocazională, omogenatul este centrifugat la 6 000 r.p.m., timp de 10 minute. Supernatantul se decantează într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu apă distilată.

În 5 ml extract se determină conținutul în glucoză prin titrare cu I_2-NaOH, conform experienței 104.

Se pipetează 25 ml extract într-un flacon termorezistent, se adaugă 5 ml HCl 2 M și se încălzește pe o baie de apă la fierbere, timp de 20 minute. După răcire, se ajustează pH mediului la valoarea 6, cu o soluție de NaOH 2 M. Hidrolizatul se transferă într-un balon cotat de 50 ml și se aduce la semn cu apă distilată. Se determină conținutul în glucoză prin titrare cu I_2-NaOH în 5 ml hidrolizat.

Calculul rezultatelor

(i) Cantitatea de glucoză din 5 ml extract (2,5 g fruct) se calculează utilizînd formula :

$$(V_i - V_e) \cdot \text{molaritate iod} \cdot 180 \text{ mg glucoză}$$

În 100 g fruct se găsește :

$$\frac{(V_i - V_e) \cdot 0{,}05 \cdot 180 \cdot 100}{25} \text{ mg glucoză}$$

De fapt, gustul dulce al fructelor este datorat „zahărului invertit", un amestec echimolecular de fructoză și glucoză. Cantitatea de zahăr invertit = 2 · cantitatea de glucoză.

În final rezultatele primei părți a experimentului trebuie exprimate în *grame zahăr invertit/100 g fruct.*

(ii) Cantitatea totală de glucoză din 5 ml hidrolizat (1,25 g fruct) = cantitatea de glucoză din zaharul invertit + cantitatea de glucoză din zaharoză.

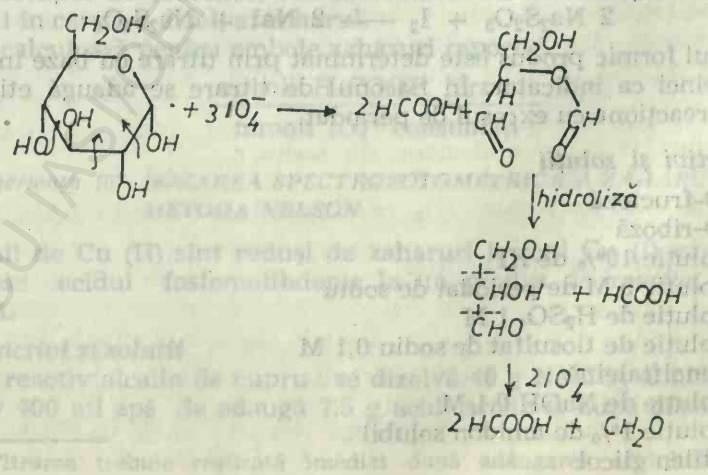
Se calculează numărul de grame de zahăr invertit derivat din zaharoză/100 g fruct.

Ținînd seama că 342 g zaharoză conduce la formarea de 360 g zahăr invertit, cantitatea de zaharoză din fructe = 0,95 x cantitatea de zahăr invertit. *Se calculează cantitatea de zaharoză, exprimată în grame din 100 g fruct.*

Experiența 106. OXIDAREA CU PERIODAT

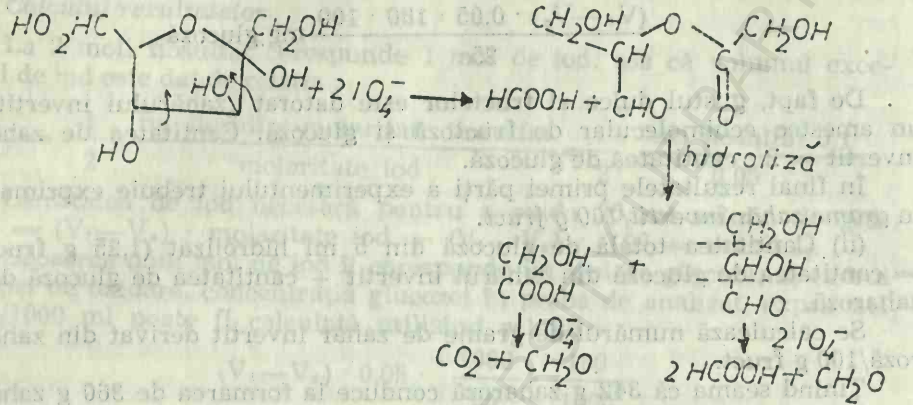
Una dintre cele mai des folosite metode de determinare a structurii zaharurilor este oxidarea cu periodat. Principiul reacției constă în scindarea legăturilor dintre doi atomi de carbon ai unei singure catene, care prezintă două funcții hidroxil adiacente și nesubstituite. Pentru fiecare legătură C-C scindată, un mol de periodat este redus la iodat.

Să considerăm oxidarea unei aldohexoze, în forma piranozică, de exemplu α-D-glucoza :



În acest caz, 5 legături C-C sînt scindate, sînt consumați 5 moli IO_4^- și 5 moli H-COOH sînt formați. Din cantitatea de periodat consumată, 3 moli de IO_4^- sînt consumați rapid, ceilalți doi intră în reacție mai lent, participînd la scindarea legăturilor dintre atomii de carbon 4, 5 și 6, numai după ce legătura esterică de la C_5 este hidrolizată.

Să considerăm oxidarea unei cetohexoze, în formă furanozică :



cînd 5 moli de periodat sînt consumați și 3 moli de acid formic sînt formați.

Studiind raportul $\frac{\text{moli H-COOH formați}}{\text{moli } IO_5^- \text{ consumați}}$ se poate face distincția între aldozaharuri și cetozaharuri. Raportul este egal cu unitatea în cazul aldozaharurilor și subunitar în cazul oxidării cetozahrurilor.

Cantitatea de periodat consumată este determinată prin reacția de eliberare a iodului din KI, în mediu acid :

$$IO_4^- + 7\ I^- + 8\ H^+ \longrightarrow 4\ I_2 + 4\ H_2O$$

iar iodul este dozat titrimetric cu tiosulfat :

$$2\ Na_2S_2O_3 + I_2 \longrightarrow 2\ NaI + Na_2S_4O_6$$

Acidul formic produs este determinat prin titrare cu baze în prezența fenolftaleinei ca indicator. În flaconul de titrare se adaugă etilen glicol pentru a reacționa cu excesul de periodat.

Reactivi și soluții

— D-fructoză
— D-riboză
— soluție 10% de KI
— soluție 5 M de periodat de sodiu
— soluție de H_2SO_4 1 M
— soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 M
— fenolftaleină
— soluție de NaOH 0,1 M
— soluție 1% de amidon solubil
— etilen glicol

Modul de lucru

Se dizolvă 250 mg D-fructoză în 5 ml apă, se adaugă 25 ml soluție 0,5 M de $NaIO_4$ și se aduce la un volum final de 50 ml. Se prepară un blanc din 25 ml apă și 25 ml soluție de periodat. Cele două probe se lasă la întuneric timp de o săptămînă.

După trecerea acestei perioade de timp, din amestecul de reacție și din blanc se scot probe de cîte 1 ml care se tratează cu 10 ml KI 10% și 3 ml H_2SO_4 1 M și se titrează iodul eliberat cu soluția de tiosulfat, în prezența amidonului *.

Pentru determinarea acidului formic format, din amestecul de reacție și din blanc se scot probe de cîte 5 ml, la care se adaugă 1 ml etilen glicol pentru a reacționa cu excesul de periodat. După 10 minute de staționare la temperatura camerii, se titrează cu soluția de hidroxid de sodiu, în prezența fenolftaleinei ca indicator.

Se repetă experimentul cu D-riboză.

Calculul rezultatelor

Cantitatea de periodat consumată (exprimată în mmoli) pentru oxidarea a 250 mg zahăr (D-fructoză sau D-riboză) se calculează utilizînd reacția :

$$\frac{50 \cdot (x-y) \cdot 0{,}1}{2}$$

unde x reprezintă numărul de mililitri de tiosulfat utilizați pentru titrarea iodului eliberat de 1 ml blanc, y reprezintă valoarea titrului unui ml amestec de reacție (deoarece mmoli de IO_4^- consumați corespund scăderii în mmoli iod eliberat). Se multiplică cu 50, pentru că volumul final al amestecului de reacție este de 50 ml, valoarea de 0,1 reprezintă molaritatea soluției de $Na_2S_2O_3$ și se împarte la 2 deoarece unui mol de iod îi corespund 2 moli de tiosulfat.

Cantitatea de acid formic formată se calculează utilizînd formula : $z \cdot 0{,}1 \cdot 10$ mmoli H-COOH obținuți din oxidarea a 250 mg zahar, unde z reprezintă numărul de ml NaOH utilizați în titrare ; 0,1 reprezintă molaritatea soluției de hidroxid, iar 10 factorul de transformare la volumul de 50 ml în care s-a dizolvat zaharul.

Se calculează pentru ambele zaharuri raportul.

$$\frac{\text{mmoli H-COOH formați}}{\text{mmoli } IO_4^- \text{ consumați}}$$

Experiența 107. DOZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A ZAHARURILOR PRIN METODA NELSON

Ionii de Cu (II) sînt reduși de zaharuri la ioni Cu (I) care la rîndul lor reduc acidul fosfomolibdenic la un produs de reacție, de culoare albastră.

Reactivi și soluții

— reactiv alcalin de cupru : se dizolvă 40 g Na_2CO_3 anhidru în aproximativ 400 ml apă. Se adaugă 7,5 g acid tartric și după dizolvarea aces-

* Titrarea trebuie realizată imediat după adăugarea acidului !

tuia se adaugă 4,5 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$. După o omogenizare energică, soluția se diluează cu apă distilată pînă la un volum final de 1 000 ml.

— reactiv fosfomolibdenic : se dizolvă 70 g acid molibdenic și 10 g wolframat de sodiu în 700 ml soluție NaOH 5%. Soluția se fierbe aproximativ 40 minute pentru a îndepărta amoniacul din acidul molibdenic. După răcire se adaugă 250 ml H_3PO_4 85% și reactivul se diluează la un volum final de 1 000 ml.

— soluție standard de glucoză 10 mg%

— soluții necunoscute de glucoză.

Modul de lucru

În șase eprubete se pipetează 0,25 ml — 0,5 ml — 0,75 ml — 1 ml — 1,5 ml și 2 ml soluție standard de glucoză și se aduce la un volum final de 2 ml cu apă distilată. Într-o a șaptea eprubetă se pipetează 2 ml apă pentru prepararea unui blanc.

Se adaugă 2 ml reactiv alcalin de cupru și se incubează pe o baie de apă, la fierbere, timp de 8 minute. În timpul acestei incubări eprubetele se astupă cu dopuri de vată pentru a preveni reoxidarea ionilor de Cu(I).

După răcirea probelor, se adaugă 2 ml reactiv fosfomolibdenic, se agită energic pentru a favoriza reacția, iar după 2 minute se adaugă 4 ml apă distilată și se citesc densitățile optice ale probelor la 630 nm față de blanc.

Se construiește o curbă etalon trasînd pe abscisă µg glucoză 2 ml, iar pe ordonată $D.O._{630}$

Se determină concentrația glucozei din probele necunoscute, iar rezultatele finale se exprimă în g/l.

Experiența 108. DOZAREA LACTOZEI DIN LAPTE

Principalul zahăr din lapte este lactoza, care constituie 4—6% din laptele de vacă și 2—3% din laptele uman. Fiind un zahăr reducător, concentrația lactozei poate fi determinată prin orice metodă convenabilă pentru zaharuri reducătoare, după deproteinizarea laptelui. În prezența experiență se realizează deproteinizarea laptelui cu o soluție de wolframat de sodiu, dozarea efectivă realizîndu-se prin metoda Nelson.

Reactivi și soluții

— reactivi de la experiența 107

— soluție 10% de wolframat de sodiu.

— soluție M/3 de acid sulfuric

— soluție stoc de lactoză 1%, preparată într-o soluție 0,2% de acid benzoic

— soluție 0,2% de acid benzoic.

Modul de lucru

La 1 ml lapte degresat prin centrifugare se adaugă 2 ml soluție wolframat de sodiu 10% și încet, sub agitare constantă, 2 ml soluție M/3 de acid sulfuric. Amestecul este adus la un volum final de 100 ml, iar după 5 minute de staționare este filtrat printr-o hîrtie de filtru Whatman No. 42.

Într-o eprubetă (No. 1) se pipetează 1 ml filtrat și 1 ml apă distilată. Într-o a doua eprubetă (No. 2) se pipetează 2 ml soluție standard de lactoză, conținînd 0,6 mg lactoză — preparată prin diluarea a 3 ml soluție stoc de lactoză la un volum final de 100 ml cu acid benzoic, soluție 0,2%. Într-o a treia eprubetă (No. 3) se prepară un blanc prin pipetarea a 2 ml apă distilată.

În fiecare eprubetă se pipetează 2 ml reactiv alcalin de cupru, se incubează pe o baie de apă la fierbere timp de 8 minute, se răcește și se adaugă 4 ml reactiv fosfomolibdenic. După 1 minut staționare, amestecurile de reacție se diluează la un volum final de 25 ml cu reactiv fosfomolibdenic, diluat 1 : 4. Se citește densitatea optică a probei No. 1 față de blanc (No. 3) și a probei No. 2 față de blanc, la 630 nm.

Calculul rezultatelor

Densitățile optice fiind proporționale cu concentrațiile este valabilă relația :

$$\frac{\text{D.O. proba 1}}{\text{D.O. proba 2}} = \frac{C_1}{C_2}$$

unde C_1 este concentrația lactozei din 0,01 ml lapte, iar

C_2 este concentrația lactozei din standard (0,6 mg).

Concentrația lactozei din lapte, exprimă în g/100 ml este dată de relația :

$$\frac{\text{D.O. proba 1}}{\text{D.O. proba 2}} \times \frac{0{,}6}{1000} \times \frac{100}{0{,}01}$$

Experiența 109. DOZAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A ZAHARURILOR REDUCĂTOARE PRIN METODA SOMOGY NELSON

În urma reacției la cald a zaharurilor reducătoare cu o soluție alcalină de tartrat de cupru se formează oxidul cupros care interacționează cu arsenomolibdatul dînd albastru de molibden, care poate fi colorimetrat. Amestecul de reacție conține sulfat de sodiu care minimalizează posibilitatea reoxidării Cu(I) sub acțiunea oxigenului atmosferic. Dozarea depinde de natura chimică a zaharului, metoda nefiind recomandabilă pentru studiul unui amestec complex de zaharuri reducătoare. Deproteinizarea probelor este realizată cu hidroxid de zinc.

Reactivi și soluții

— reactiv alcalin de cupru : se dizolvă, 4 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 24 g Na_2CO_3 anhidru, 16 g tartrat de sodiu și potasiu, 180 g Na_2SO_4 anhidru în apă distilată și se aduce la un volum final de 1 000 ml.

— reactiv aresonomolibdat : se dizolvă 25 g molibdat de amoniu în 450 ml apă distilată și se adaugă 21 ml H_2SO_4 concentrat sub agitare. 3 g $NaHAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ dizolvate în 25 ml apă sînt adăugate, sub agitare, iar soluția rezultată este incubată la 37°C timp de 24 ore. Reactivul este păstrat într-o sticlă brună, închisă ermetic.

— soluție de $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 5%

— soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3 M

— soluții stoc de zaharuri (glucoză, fructoză și maltoză) 0,1% preparare în acid benzoic saturat.

— soluții standard de zaharuri, preparate prin diluarea de zece ori (100 μg/ml) a soluțiilor stoc.

Modul de lucru

Din soluția de testat se pipetează 0,1 ml într-o eprubetă cu 1,5 ml apă și se omogenizează prin amestecare energică. Se adaugă 0,2 ml soluție de $Ba(OH)_2$ și 0,2 ml soluție de sulfat de zinc. După centrifugare, se utilizează 1 ml pentru analiză.

Se adaugă 1 ml reactiv alcalin de cupru, se amestecă și se incubează pe o baie de apă timp de 15 minute. După răcirea probelor se adaugă 1 ml reactiv arsenomolibdenic, iar după un minut se diluează cu apă distilată pînă la un volum final de 10 ml și se citește densitatea optică la 510 nm față de un blanc cu 1 ml apă distilată.

Densitatea optică citită la 510 nm este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Din soluția standard (100 μg/ml) se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml și 1 ml în 10 eprubete și se aduce la un volum final de 1 ml cu apă distilată. În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml reactiv alcalin de cupru, se amestecă, se incubează 15 minute pe baie de apă în fierbere, se răcesc și se adaugă 1 ml reactiv arsenomolibdat. După diluția la un volum final de 10 ml se citește extincția la 510 nm față de blanc. Curba etalon se trasează indicînd pe abscisă μg zahăr/ml iar pe ordonată $D.O._{510\ nm}$

Sensibilitatea dozării poate fi crescută prin citirea densităților optice la 660 nm (maximum de absorbție), dar se preferă o lungime de undă mai mică care minimalizează efectele variațiilor în reactivul blanc și reoxidarea oxidului cupros.

Timpul de incubare trebuie tatonat anterior, variindu-se de la un zahăr la altul.

Experiența 110. DOZAREA ZAHARURILOR REDUCĂTOARE PRIN METODA PARK JOHNSON

Dozarea zaharurilor reducătoare se bazează pe reducerea fericianurii în mediu alcalin cu formarea unui produs de reacție de culoare albastră, colorimetrabil la 690 nm.

Reactivi și soluții

— soluția de fericianură : se dizolvă 0,5 g $K_3Fe(CN)_6$ în apă distilată și se aduce la un volum final de 1 000 ml. Soluția se păstrează în sticlă brună.

— reactiv carbonat-cianură : se dizolvă 5,3 g Na_2CO_3 și 0,65 g KCN în apă distilată și se aduce la un volum final de 1 000 ml.

— reactiv de sulfat de fier și amoniu : se dizolvă 1,5 g $FeNH_4(SO)_2$ și 1 g lauril sulfat de sodiu într-un volum final de 1 000 ml H_2SO_4 0.05 N.

— soluție standard de glucoză 10 mg la 1 000 ml (10 μg/ml).

Modul de lucru

Se supune proba de analizat unei hidrolize acide, timp de 4 ore prin tratarea 1 g țesut cu 100 ml H_2SO_4 1 N, după care se neutralizează cu o soluție de NaOH 1N. 1 ml hidrolizat neutralizat este trat cu 1 ml soluție de fericianură și cu 1 ml reactiv carbonat-cianură. După amestecare energică, proba este incubat ăpe baie de apă la fierbere timp de 15 minute după care este răcită. Se adaugă 5 ml reactiv sulfat de fier și amoniu, iar după 15 minute se citește densitatea optică la 690 nm față de un banc preparat identic cu 1 ml apă distilată în loc de hidrolizat.

Densitatea optică este transformată în termeni de cocnentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Din soluția standard de glucoză se prepară diluții astfel încît concentrația de glucoză din mediu să varieze de la 1 la 10 μg/ml. Diluțiile sînt prelucrate identic cu proba. Pe abscisă se indică valorile densităților optice citite la 690 nm, iar pe ordonată μg glucoză/ml.

În această metodă neutralizarea probelor deproteinizate sau a hidrolizatelor este esențială deoarece la un pH de reacție mai mic decît 10,5 are loc o reducere incompletă în timpul etapei de incubare. De asemenea, la adiția reactivului cu sulfat de fier și amoniu la pH acide apare o turbiditate.

Experiența 111. DIFERENȚIEREA HEXOZELOR ÎN SOLUȚII PRIN REACȚIA CU CARBAZOL

Diferitele hexoze prin încălzire cu acid sulfuric și carbazol dau produși colorați caracteristic ce permit diferențierea lor în amestecuri și dozarea lor.

Reactivi și soluții

— reactiv acid : se amestecă cu grijă 8 părți H_2SO_4 concentrat și o parte de apă distilată ;

— soluție 0,5% de carbazol în etanol absolut (este stabilă timp de 2 luni de la preparare) ;

— soluții standard 20 mg % de glucoză, galactoză, manoză.

Modul de lucru. La 9 ml reactiv acid, răcit pe o baie de gheață, se adaugă 1 ml probă de analizat (50—200 μg zaharuri), se agită energic și din nou se plasează pe baia de gheață. Apoi se adaugă 0,3 ml soluție carbazol și se incubează pe o baie de apă la fierbere timp de 10 minute.

Se realizează trei curbe stalon pentru glucoză, galactoză și manoză. Din proba a 4-a (100 μg zahăr) se fac spectrele de absorbție la un Specord UV—VIS și se determină maximele de absorbție. Se citesc curbele etalon la maximul de absorbție al fiecărui zahăr. Din proba a 4-a se determină raportul densităților optice la 540 nm și 440 nm pentru fiecare zahăr. Acest raport este utilizat pentru recunoașterea hexozelor : glucoza — 4,89 ; galactoza — 1,9 ; manoza — 0,81. Se determină raportul $D.O._{540}$ /DO_{440} în sînge, pentru evaluarea calitativă a hexozelor. După identificarea glucidelor se determină densitatea optică la maximum de absorbție, pentru o evaluare cantitativă.

Experiența 112. DOZAREA HEXOZELOR TOTALE PRIN REACȚIA CU CISTEINĂ ÎN MEDIU DE ACID SULFURIC

Dische a descris o metodă de dozare a hexozelor utilizînd reacția lor cu cisteină-H_2SO_4. În anumite condiții reacția poate fi folosită pentru dozarea manozei, a heptozelor și metilpentozelor.

Soluții

— reactiv acid : se prepară prin amestecare a 6 părți H_2SO_4 concentrat cu o parte de apă ;

— soluție 3% de cisteină hidroclorică, proaspăt preparată în apă ;

— soluții standard de hexoze (glucoză, fructoză, galactoză, manoză) de o cocnentrație 10 mg%.

Modul de lucru

La 4,5 ml reactiv acid, răcit pe o baie de gheață, se adaugă 1 ml soluție conținînd hexoze (10—100 μg), se agită energic și se răcește pe baia de gheață. După cîteva minute, amestecul de reacție se incubează exact 3 minute pe o baie de apă la fierbere. După răcire, se adaugă 0,1 ml soluție de cisteină. Prezența hexozelor este evidențiată prin apariția unei colorații galbene, cu un maxim de absorbție la 514 nm. Diferența dintre densitățile optice citite la 415 nm si 380 nm ($D.O._{415}$—$D.O._{380}$) permite dozarea concentrației de hexoze din mediu.

Studiul spectrelor de absorbție ale produșilor de reacție cu glucoza, fructoza, galactoza și manoză indică același maxim de absorbție la 415 nm, a cărui înălțime diferă. Astfel la o cocnetnrație de 50 μg/ml, la 415 nm glucoza dă un produs de reacție cu o densitate optică egală cu 1,0 — fructoza, 1,04 — galactoza, 0,58 iar manoza, 0,45. Pentru dozări cantitative, citirea densității optice trebuie realizată la două ore după adiția soluției de cisteină. Prin staționare la temperatura camerii, produșii reacției primare fiind instabili, maximul de absorbție de la 415 nm dispare. În acest timp, hexozele dau alte reacții de culoare ce le pot diferenția. Astfel, galactoza și sorboza formează un produs de reacție de culoare albastră, glucoza și fructoza — verde, iar manoza — galben.

Hexozele fosforilate reacționează similar. Metilpentozele dau o coloratie galben-pal, cu un maxim de absorbție la 400 nm. Absorbția datorată acestor compuși este egală la 380 nm și 415 nm fiind slabă pentru pentoze, deoxipentoze și acizi hexuronici. Diferența $D.O._{415}$—$D.O._{380}$ este zero pentru metilpentoze și neglijabilă pentru toți compușii menționați, cu excepția hexozelor.

Practic, se vor realiza patru curbe etalon pentru — glucoză, fructoză, galactoză și manoză prin diluarea soluțiilor standard. Se pipetează în 10 eprubete 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml și 1 ml soluție standard și se aduce la un volum final de 1 ml cu apă distilată. În continuare se realizează reacția de culoare cu cisteină-H_2SO_4 conform modului de lucru descris anterior. Se trasează curbe etalon $D.O._{415}$/ concentrația în hexoză și se compară pantele acestor drepte. Se trasează și patru curbe etalon $D.O._{415}$—$D.O._{380}$/concentrație pentru determinarea cantitativă a conținutului de hexoze totale dintr-o probă necunoscută. După staționare timp de 48 ore la temperatura camerii, se vor face aprecieri calitative și asupra naturii chimice a hexozelor prezente în proba necunoscută.

Experiența 113. DOZAREA MANOZEI PRIN REACȚIA CU CISTEINĂ ÎN MEDIU DE ACID SULFURIC

În această metodă condițiile reacției descrise de Dische au fost adaptate pentru dozarea cantitativă a manozei.

Reacivi și soluții.

— reactiv acid : se amestecă cu grijă 7 părți H_2SO_4 concentrat cu 3 părți apă

— soluție 3% de cisteină hidroclorică, proaspăt preparată în apă

— soluție standard de manoză 10 mg%.

Modul de lucru

La 0,9 ml soluție conținînd 50—100 μg hexoză se adaugă 0,1 ml soluție de cisteină hidroclorică și 5 ml reactiv acid. Proba este incubată timp de 10 minute pe o baie de apă în fierbere, răcită în jet de apă și colorimetrată la 370 nm și 400 nm față de apă, după 48 ore staționare la temperatura camerii.

Deși toate hexozele reacționează cu cisteina în prezența de acid sulfuric totuși există posibilitatea de a formula expresii care servesc la identificarea și dozarea a trei zaharuri. De exemplu relația ($D.O._{375}$—$D.O._{400}$)—($D.O._{350}$—$D.O._{375}$) este zero pentru galacoză, negativă pentru glucoză, fiind proporțională cu concetnrația de manoză. De asemenea este zero pentru metilpentoze și DNA, iar pentozele și acizii hexuronici dau valori negative.

Deoarece în timp galactoza formează un produs de reacție colorat în albastru cu un maxim la 600 nm, raportul $D.O._{600}/(D.O._{350}—D.O._{375})$ poate fi folosit pentru identificarea acestei hexoze. Raportul este 4,5 pentru galctoză, și sub 1,4 pentru glucoză, manoză și fructoză.

Pentru determinarea unor cantități de 20—100 μg manoză în prezența altor zaharuri, diferența $D.O._{370}$—$D.O._{400}$ poate fi folosită. În cazul deoxiribozei, metilpentozelor și acizilor hexuronici această diferență este zero sau nesemnificativă. Prezența pentozelor libere în proba necunoscută poate fi evidențiată ușor prin măsurarea $D.O._{320}$—$D.O._{340}$ la două ore și 48 ore de la reacție. Dacă această valoare crește este un indiciu că proba conține cantități mari de pentoze și acizi hexuronici.

Practic se va realiza o curbă etalon pentru manoză prin diluarea soluției standard. În 9 eprubete se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 nl — 0,8 ml și 0,9 ml soluție standard și se aduce la un volum final de 0,9 ml cu apă distilată. În continuare se realizează reacția cu cisteină-H_2SO_4 conform modului descris anterior. Se trasează o curbă etalon $D.O._{370}$—$D.O._{400}$/concentrația de manoză. Se determină concentrația de manoză dintr-o probă necunoscută. Se va cerceta prezența pentozelor libere și a acizilor hexuronici în probă prin determinarea $D.O._{320}$—$D.O._{340}$ la 2 ore și 48 ore de reacție.

Experiența 114. DOZAREA HEXOZELOR TOTALE CU ANTRONĂ

Metoda descrisă de Scott și Melvin permite determinarea hexozelor totale, aldopentozelor și acizilor hexuronici, în stare liberă sau prezenți în polizaharide, prin reacția lor cu antronă, în mediu de acid sulfuric

concentrat. În prezența acidului sulfuric, hexozele suferă reacții de deshidratare formînd derivați ai furfuralului care condensează cu antrona generînd un produs colorat în albastru-verde care are un maxim de absorbție la 620 nm. Reacția nu se pretează pentru dozarea unor preparate proteice care conțin mult triptofan deoarece acest aminoacid dă un produs colorat în roșu care interferează.

Mecanismul reacției cu antrona nu este este încă elucidat.

Rezultatele dozării cu antronă sînt influențate și de reactivii utilizați în deproteinizarea probelor.

Reactivi și soluții

— reactiv cu antronă : 0,2 g antronă se dizolvăîn 100 ml acid sulfuric concentrat

— soluție standard de glucoză 10 mg%

— soluție standard de glicogen 10 mg%

— soluție de acid tricloracetic 5%.

Modul de lucru

Dozarea hexozelor totale va fi realizată practic din sînge. Se realizează operația de deproteinizare a probei de sînge prin amestecarea a 0,2 ml sînge cu1,8 ml soluție de acid tricloracetic 5%, urmată de centrifugare la 7 000 t.p.m. timp de 5 minute. 1 ml supernatant se tratează cu 4 ml reactiv antronă și apoi se incubează pe o baie de apă în fierbere timp de 10 minute. După răcire probele sînt colorimetrate la 620 nm față de un blanc preparat cu 1 ml apă. Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon.

Din soluția standard de glucoză se pipetează în 10 eprubete 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml și 1 ml și se aduce la un volum final de 1 ml cu apă distilată. În continuare se realizează reacția cu antronă conform modului de lucru descris anterior. Se trasează curba etalon $D.O._{620}$ /concentrație glucoză.

Valoarea concentrației de glucoză determinată pentru proba de sînge trebuie multiplicată cu factorul de diluție (× 10) aplicat în cadrul operației de deproteinizare. Valorile glicemiei se exprimă în mg glucoză în 100 ml sînge.

Factorul care limtiează utilzarea și sensibilitatea metodei cu antronă este instabilitatea reactivului, care în timp suferă procese oxidative și proprietățile lui cromogene scad considerabil. Pentru a elimina acest dezavantaj, fie se lucrează cu reactiv proaspăt preparat, fie se introduce tiouree ca antioxidant. Prin introducerea unei concentrații de tiouree de 1%, reactivul poate fi păstrat la rece timp de 2 săptămîni fără modificarea capacității lui cromatogene. De asemenea, coloratia albastru-verde a produsului de condensare cu antrona scade în timp, mai rapid sub acțiunea luminii solare, de aceea probele trebuie colorimetrate în decursul unui interval de 30 minute după fierbere.

Valorile cele mai mari sînt obținute în cazul deproteinizării cu soluții de acid tricloracetic, mai scăzut în cazul utilizării cu $ZnSo_4 \cdot 7\,H_2O$ 5% + $Ba(OH)_2$ 0,3 N și minime în cazul deproteinizării cu $Na_2WO_4 \cdot 2\,H_2O$ 10% + H_2SO_4 0,66 N.

Experiența 115. DOZAREA ZAHARURILOR REDUCĂTOARE CU FENOL-ACID SULFURIC

Metoda descrisă de Dubois și colab. permite dozarea cantitativă a zaharurilor simple, oligozaharidelor, polizaharidelor și derivaților lor care posedă grupări reducătoare. Metoda nu este aplicabilă pentru aminozaharuri, alcool zaharuri și nu este suficient de sensibilă pentru dozarea pentozelor. Procedeul poate fi folosit și pentru vizualizarea zaharurilor separate cromatografic.

Reactivi și soluții

— soluție standard de glucoză 50 mg%

— soluție 5% de fenol, proaspăt preparată în apă distilată

— acid sulfuric concentrat

Modul de lucru

0,2 ml probă în care dorim să dozăm zaharurile reducătoare se tratează cu 0,2 ml soluție fenol și cu 2 ml acid sulfuric concentrat. După ce se agită energic, probele sînt lăsate la temperatura camerii timp de 30 minute, după care se citește densitatea optică la 490 nm față de un blanc preparat cu 0,2 ml apă. Culoarea este stabilită la temperatura camerii aproximativ trei ore. Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon.

În cinci eprubete se realizează diluții ale soluției standard prin pipetarea a 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml și 0,5 ml din aceasta, urmată de aducerea la un volum final de 2 ml cu apă distilată. Din fiecare eprubetă se scot probe de cîte 0,2 ml(5 — 10 — 15 — 20 — 25 μg) care se prelucrează conform modului delucru descris anterior. Se trasează curba etalon prin indicarea pe abscisă a concentrațiilor (μg glucoză 0,2 ml) iar pe ordonată a $D.O._{490nm}$.

Experiența 116. DOZAREA ZAHARURILOR REDUCĂTOARE CU o-TOLUIDINĂ

În prezența acidului acetic, la cald, zaharurile reducătoare formează cu o-toluidina un complex colorat care prezintă un maxim de absorbție la 630 nm.

Reactivi și soluții

— reactiv o-toluidină : se dizolvă 1,5 g tiouree în acid acetic glacial prin ușoară încălzire, se adaugă 60 ml o-toluidină proaspăt distilată, se amestecă prin agitare și se aduce la un volum final de 1 000 ml cu acid acetic glacial. Reactivul se păstrează în sticle brune.

— soluție standard de glucoză 100 mg% preparată într-o soluție saturată în acid benzoic

— soluție 5% de acid tricloracetic.

Modul de lucru

În cadrul acestui experiment se va doza concentrația glucozei din sînge. În scopul deproteinizării probei de sînge se tratează 1,9 ml soluție

5% de acid tricloracetic cu 0,1 ml sînge, se centrifughează amestecul la 7 000 t.p.m. timp de 5 minute și se păstrează supernatantul.

1 ml supernatant este tratat cu 5 ml reactiv o-toluidină și după agitare energică se încubează pe o baie de apă în fierbere timp de 10 minute. După răcire se citește densitatea optică a probei la 630 nm față de un blanc realizat similar dar cu 1 ml apă. Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml și 1 ml soluție standard de glucoză și se aduce la un volum final de 1 ml cu apă distilată. În fiecare probă se adaugă cîte 5 ml reactiv o-toluidină și se procedează ca în modul descris anterior. Se citesc densitățile optice ale probelor față de blanc și se trasează curba etalon indicînd pe ordonată $D.O._{630}$ nm iar pe abscisă mg glucoză/ml.

Valoarea obținută în dozarea probei de sînge trebuie multiplicată cu 2 000 pentru ca rezultatul să fie exprimat în mg glucoză în 100 ml sînge.

Experiența 117. DOZAREA CETOHEXOZELOR PRIN METODA ROE

Dozarea cetohexozelor cu orcinol descrisă de Roe și colab. reprezintă o modificare a reacției Seliwanoff. Deproteinizarea materialului biologic se face cu $Ba(OH)_2$ — $ZnSO_4$.

Reactivi și soluții

— reactiv rezorcinol : se prepară prin dizolvarea a 0,1 g rezorcinol și 0,25 g tiouree în 100 ml acid acetic glacial. Reactivul se păstrează la întuneric.

— reactiv acid : se prepară prin diluarea a 5 părți HCl concentrat cu o parte apă distilată.

— soluție standard de fructoză 10 mg%, preparată într-o soluție saturată în acid benzoic

— soluție de hidroxid de bariu 1,8%

— soluție de $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 2%.

Modul de lucru

La 0,1 ml probă (sînge, extract tisular) se adaugă 1,9 ml apă, 1 ml soluție $Ba(OH)_2$, 1 ml soluție $ZnSO_4$ și după o agitare energică se centrifughează la 2 000 r.p.m. timp de 20 minute.

2 ml supernatant se tratează cu 1 ml reactiv orcinol și 7 ml reactiv acid, după care amestecul de reacție este incubat timp de 10 minute pe o baie de apă la 80°C. După răcire proba este colorimetrată la 520 nm față de un blanc preparat cu 2 ml apă. Deoarece culoarea produsului de reacție se modifică în timp, colorimetrarea trebuie realizată în maximum 30 minute de la incubare.

Densitatea optică trebuie transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Se pipetează 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml soluție standard de fructoză în șapte eprubete și se aduce la un volum final de 2 ml. Probele care conțin 20 μg și 80 μg fructoză sînt prelucrate similar ca supernatantul rezultat din defecarea sîngelui. Pentru a exprima rezultatele experimentale în mg fructoză/100 ml sînge valoarea obținută prin extrapolarea densității optice la 520 nm pe curba etalon trebuie multiplicată cu 2.

Scăderea temperaturii de incubare de la 100°C la 80°C reduce intensitatea culorii produsului de reacție, dar mărește specificitatea reacției. Astfel, glucoza nu interferă la concentrație de 1 mg/ml. Riboza și adenozina reacționează formînd un produs de reacție de culoare verde care prezintă o absorbție de numai 1% din cea a fructozei la 520 nm. Ribozo-5-P dă un produs roz cu același maxim de absorbție ca fructoza, dar cu un coeficient de extincție mult mai mic. Cetopentozele interferă în această dozare deoarece formează un produs de reacție care absoarbe la 620 nm. Prezența unei cetopentoze este indicată de un raport $D.O._{620}/D.O._{520}$ mare.

Experiența 118. DOZAREA CETOHEXOZELOR CU REACTIV CISTEINĂ CARBAZOL

Prin această metodă se pot doza fructoza, sorboza și inulina care reacționează cu cisteina și carbazolul formînd produși de reacție de culoare roz, care au un maxim de absorbție la 560 nm.

Reactivi și soluții

— reactiv acid : se prepară prin amestecarea a 7 părți de H_2SO_4 concentrat și 3 părți apă distilată.

— soluție carbazol 0,12% preparată în etanol absolut.

— soluție 1,5% de cisteină hidroclorică, proaspăt preparată în apă distilată.

— soluție standard de fructoză 50 mg în 1 000 ml apă.

— reactivii de defecare utilizați în Experiența 117.

Modul de lucru

Deproteinizarea probei se realizează similar modului descris în experiența anterioară. La 1 ml supernatant se adaugă 0,2 ml soluție cisteină, 6 ml reactiv acid și 0,2 ml soluție carbazol. După o agitare energică se dezvoltă în 10 minute o culoare roz. Pentru determinări cantitative, după 24 ore de staționare la temperatura camerii se măsoară diferența densităților optice la 560 nm și 750 nm ($D.O._{560}$—$D.O._{750}$) față de un blanc preparat cu 1 ml apă. Simultan pot fi dozate triozele, în cantități mici de la 1 — 10 μg/ml, prin determinarea diferenței $D.O._{650}$ — $D.O._{470}$. Culoarea albastră dezvoltată de trioze apare mult mai tîrziu și are un maxim de absorbție la 650 nm.

Diferența densităților optice $D.O._{560}$ — $D.O._{750}$ trebuie transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. În cinci eprubete se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml și 0,5 ml soluție standard de fructoză și se aduce la un volum final de 1 ml. Aceste cinci probe care conțin între 1 — 50 μg/ml fructoză sînt tratate similar cu proba de sînge deproteinizată. Se trasează o curbă etalon indicînd pe abscisă μg/ml fructoză, iar pe ordonată diferența densităților optice la 560 nm și 750 nm.

Reacția cu carbazol este mult mai sensibilă decît metoda lui Roe Cetopentozofosfații reacționează similar, dau produși de culoare portocalie care absorb la 540 nm. Ribuloza reacționează chiar mai rapid decît fructoza, citirea putînd fi realizată după 15 minute. Aldopentozele sînt

mult mai puțin reactive decît cetopentozele. Glucoza nu interferă în concentrații mai mici de 100 μg/ml.

Dacă deproteinizarea se realizează cu acid tricloracetic, concentrația lui în extractele tisulare nu trebuie să depășească 2,5% și ea trebuie să fie compensată cu un blanc.

Experiența 119. DOZAREA PENTOZELOR PRIN REACȚIA BIAL

Experiența va fi condusă conform metodei descrise de Mejbaum prin care se pot doza cantitativ pentozele : arabinoza, riboza, lizoza și xiloza.

Reacivi și soluții.

— soluție 0,1% $FeCl_3$ preparată în HCl concentrat.

— soluție proaspăt preparată 100 mg/ml de orcinol în etanol 95%. Substanța trebuie recristalizată din benzen.

— soluție standard de riboză 10 mg în 1000 ml apă.

Modul de lucru

La 3 ml probă se adaugă 3 ml soluție clorură ferică și 0,3 ml reactiv orcinol. După incubarea probei pe o baie de apă în fierbere timp de 40 minute, aceasta se răcește și se colorimetrează față de un blanc preparat similar dar cu 3 ml apă. Pentru a evita procesul de evaporare, incubarea se face în eprubete cu dop rodat ,închise. Colorimetrarea se realizează la 670 nm.

Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. În 5 eprubete se pipetează 1 ml — 1,5 ml — 2,5 ml și 3 ml soluție standard de riboză și se aduce la un volum final de 3 ml. În cele 5 probe în care concentrația în riboză variază de la 10—30 μg/3 ml se adaugă cîte 3 ml soluție $FeCl_3$ și 0,3 ml reactiv orcinol. După incubare și răcire, se colorimetrează la 670 nm față de blanc. Se construiește curba etalon.

După 20 minute de incubare la 100° C pentozele libere și ribozo-3-fosfatul își dezvoltă numai 88% din culoarea lor, timpul necesar pentru producerea maximului de intensitate fiind de 40 minute. O dată cu creșterea timpului de incubare se mărește gradul de interferență a altor zaharuri. Astfel, glucoza interferă puțin cînd incubarea se realizează perioade scurte de timp, absorbția ei crescînd chiar după 60 minute. Produsul de reacție al glucozei are un maxim de absorție la 580 nm, de aceea unii autori folosesc diferența $D.O._{670} - _{580}$.

Experiența 120. DOZAREA PENTOZELOR CU CISTEINĂ-H_2SO_4

În prezența acidului sulfuric concentrat, cisteina reacționează cu diferite clase de zaharuri dînd produși colorimetrabili. În experiența prezentă se va determina concentrația pentozelor în prezența altor zaharuri.

Reactivi și soluții

— acid sulfuric concentrat foarte pur (fără As și N)

— soluție 3% de cisteină hidroclorică, proaspăt preparată

— soluție standard de riboză 50 mg în 1 000 ml apă

Modul de lucru

1 ml probă se tratează, sub răcire, cu 4 ml H_2SO_4 concentrat. Amestecul de reacție este agitat energic și răcit sub jet de apă. Se lasă proba timp de 2 ore la temperatura camerii, agitînd din cînd în cînd, după care se adaugă 0,1 ml cisteină și exact după 15 minute se colorimetrează la 390 nm față de un blanc preparat identic, dar cu 1 ml apă. În prezența hexozelor, colorimetrarea în vederea dozării pentozelor se realizează atît la 390 nm cît și la 425 nm, făcîndu-se diferența $D.O._{390}$ — $D.O._{425}$.

Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. În eprubete se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml — 1 ml soluție standard de riboză și se aduce la un volum final de 1 ml cu apă distilată. Diluțiile sînt tratate similar cu proba necunoscută, se colorimetrează și se trasează curba etalon.

Pentozele, hexozele și acizii hexuronici reacționează complet cu cisteina după 10 minute la temperatura camerii. Metilpentozele și DNA reacționează mult mai lent. Produșii lor de reacție au maxime de absorbție între 375 nm — 410 nm. Curbele de absorbție ale acizilor hexuronici și pentozelor au același maxim la 390 nm. Produșii de reacție a DNA, metilpentozelor și hexozelor au maxime de absorbție la 375, 400 nm și respectiv la 408 nm.

$D.O._{390}$ — $D.O._{425}$ este o măsură cantitativă a pentozelor din soluție în domeniul 10 — 100 μg ; valoarea fiind zero la 10—30 minute de incubare după adiția cisteinei pentru toate aldohexozele și mică pentru cetohexoze. Acizii hexuronici, deoxi- și metilpentozele influențează neglijabil valoarea.

Deoarece diferitele pentoze au diferite valori $D.O._{390}$ — $D.O._{425}$ nu este posibilă determinarea cantității lor totale într-o soluție conținînd mai mult decît un reprezentant al acestei clase de zaharuri.

Experiența 121. DOZAREA ACIZILOR URONICI CU NAFTOREZORCINOL

În această experiență este prezentată dozarea acizilor uronici conform metodei descrise de Deichmann, utilizînd reacția acestora cu naftorezorcinol.

Reactivi și soluții

— soluție 10% de naftorezorcinol în etanol 95%. Reactivul trebuie filtrat înaintea utilizării. Poate fi păstrat cîteva zile la întuneric și la rece.

— HCl concentrat

— reactiv acid : HCl 19%

— soluție standard de acid uronic : 40 mg în 1 000 ml apă

Modul de lucru

În eprubete cu dop rodat se pipetează 5 ml probă, 0,2 ml HCl 19%, se astupă și se incubează 45 minute pe o baie de apă la 75°C. După incubare se adaugă 5 ml HCl concentrat și 1 ml soluție de naftorezorcinol și se plasează pe o baie de apă la 50°C timp de 90 minute. După răcire, produsul de reacție colorat este extras cu 10 ml eter. Se separă stratul

eteric, se aduce la un volum final de 15 ml cu eter etilic și se colorimetrează la 570 nm. Culoarea roșie este stabilă o oră.

Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. În 5 eprubete se pipetează cîte 1 ml — 2 ml — 3 ml — 4 ml și 5 ml soluție standard de acid uronic și se aduce la un volum final de 5 ml cu apă distilată. Cele cinci probe cu concentrații cunoscute de acid uronic, variind de la 40 — 200 μg/5 ml sînt prelucrate similar cu proba necunoscută.

Metoda se pretează pentru dozarea acidului glucuronic și hexuronizilor în urină.

Experiența 122. DOZAREA ACIZILOR URONICI CU CARBAZOL

Este prezentată metoda de dozare a acizilor uronici utilizînd reacția lor cu carbazolul, descrisă de Dische în 1950.

Reactivi și soluții

— soluție 0,1% de carbazol preparată în etanol absolut
— acid sulfuric concentrat
— soluție standard de acid uronic, 10 mg %

Modul de lucru

Proba, 1 ml este tratată cu 6 ml H_2SO_4 concentrat și amestecul este agitat viguros, sub jet de apă. După o incubare timp de 20 minute pe baie de apă în fierbere se adaugă 0,2 ml soluție carbazol. După 2 ore de staționare la temperatura camerii, se colorimetrează la 530 nm față de un blanc preparat identic, dar cu 1 ml apă.

Densitatea optică este transformată în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Se pipetează 0,1 ml — 0,2 ml — 0,3 ml — 0,4 ml — 0,5 ml — 0,6 ml — 0,7 ml — 0,8 ml — 0,9 ml și 1 ml de soluție standard de acid uronic și se aduce la un volum final de 1 ml, cu apă distilată. Probele cu concentrații cunoscute de acid uronic, variind de la 5—100 μg/ml sînt tratate similar cu proba necunoscută. Se trasează curba etalon.

În comparație cu metoda reacției acizilor uronici cu naftorezorcinol, procedeul care utilizează carbazol este mult mai specific. Acizii ascorbic, mucic și hidroxipiruvic care interferau în metoda anterioară, în acest procedeu nu mai influențează rezultatele. Pentozele și hexozele în concentrații mari interferă formînd produși de reacție, de culoare galbenă și respectiv roșu-maroniu. În scopuri calitative aceste zaharuri pot fi deosebite de acizii uronici prin testul diluției cu apă : adiția de 3,8 ml apă la amestecul de reacție induce o intensificare a culorii violet care apare în cazul zaharurilor, în timp ce în cazul acizilor uronici se decolorează în cîteva minute. Metoda nu poate fi utilizată în cazul dozării acizilor uronici din polizaharide.

Experiența 123. DOZAREA ENZIMATICĂ CU o-DIANISIDINĂ

Glucoza este oxidată la acid gluconic și peroxid de hidrogen sub acțiunea catalitică a glucozoxidazei. Peroxidul de hidrogen oxidează

o-dianisidina, în prezența peroxidazei, cu formarea unui produs colorat care poate fi colorimetrat la 436 nm. Cantitatea de colorant formată este proporțională cu glucoza oxidată.

$$\text{D-glucoza} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{glucozoxidaza}} \text{acid gluconic} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{peroxidaza}} 2\,H_2O + D$$

Reactivi și soluții

— soluție tamponată de enzime : se dizolvă 2,07 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ 1,09 g $NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$, 225 U peroxidază, 1 400 U glucozoxidază în apă distilată și se aduce la un volum final de 150 ml, apoi se adaugă cîteva picături de cloroform pentru stabilizare :

— soluție de o-dianisidină hidroclorică 5 mg/ml ;

— reactiv glucoză : se adaugă 0,5 ml soluție de o-dianisidină la 50 ml soluție tamponată de enzime

— soluție standard de glucoză 91 μg/ml : se dizolvă 0,1 g glucoză în apă distilată, se adaugă 25 ml acid percloric și se diluează la 1 000 ml cu apă distilată

— solutie acetat de uranil 0,16% preparată într-o soluție de NaCl 0,9%

Modul de lucru

Pentru deproteinizarea probei se tratează 1 ml soluție de acetat de uranil cu 0,1 ml sînge și se centrifughează la 3 000 t.p.m. timp de 5 minute. 0,2 ml supernatant și 5 ml reactiv glucoză se incubează 30 minute la temperatura camerii. Densitatea optică la 436 nm a probei este citită față de un blanc în care 0,2 ml apă sînt tratați similar ($D.O._{proba}$). Pentru calibrare 0,2 ml soluție standard de glucoză și 5 ml reactiv glucoză se incubează 30 minute la temperatura camerii, după care se citește densitatea optică față de blanc ($D.O._{standard}$).

Ținînd seama că în 0,2 ml soluție standard sînt 18,2 μg glucoză, concentrația glucozei în probă, exprimată în mg/ml, se calculează utilizînd formula :

$$\frac{D.O._{probă} \times 5 \times 0{,}0182}{D.O._{standard}}$$

unde 5 este un factor de transformare de la 0,2 ml la 1 ml

Experiența 124. DOZAREA ENZIMATICĂ A GLUCOZEI CU ABTS

2,2 -azino-di-(3-etilbenztiazolin)-6-sulfonatul (ABTS) este un cromogen foarte solubil în apă, insensibil la lumină și neautooxidabil care permite dozarea enzimatică a glucozei cu o mai mare sensibilitate decît cu o-dianisidina. Principiul reacției este același ca în cazul experienței 123.

Reactivi și soluții

— reactiv glucoză : se dizolvă 2,07 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, 1,09 g $NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$, 225 U peroxidază, 1 400 U glucozoxidază și 0,075 g

ABTS în apă distilată și se aduce la un volum final de 150 ml, apoi se adaugă cîteva picături de cloroform pentru a evita creșterea microbiană.

— soluție standard de glucoză 91 μg/ml

— soluție acetat de uranil 0,16% preparată într-o soluție de NaCl 0,9%.

Modul de lucru

Deproteinizarea probei de sînge se realizează conform modului descris în experiența 123. 0,1 ml supernatant se tratează cu 5 ml reactiv glucoză, se incubează la temperatura camerii timp de 30 minute și se citește densitatea optică la 436 nm față de un blanc preparat similar, dar cu 0,1 ml apă ($D.O._{probă}$). Pentru calibrare 0,1 ml soluție standard de glucoză (0,0091 mg) se tratează similar și se citește densitatea optică față de blanc ($D.O._{standard}$).

Concentrația glucozei în probă, exprimată în mg/ml, se calculează utilizînd formula :

$$\frac{D.O._{probă} \times 10 \times 0{,}0091}{D.O._{standard}}$$

unde 10 este un factor de transformare de la 0,1 ml la 1 ml.

Experiența 125. DOZAREA ENZIMATICĂ A GALACTOZEI

Galactoza reacționează cu NAD^+, sub acțiunea catalitică a galactozo-dehidrogenazei, conform ecuației :

$$\beta\text{-D-galactoza} + NAD^+ \xrightarrow{\text{galactozo dehidrogenază}} \text{D-galactono-}\delta\text{-lactona} + NADH + H^+$$

Formarea NADH este măsurată prin creșterea densității optice la 340 nm, care este proporțională cu cantitatea de galactoză.

Reactivi și soluții

— soluție tampon tris 0,1 M — HCl N pH 8,6

— soluție NAD^+ 12,5 mg/ml

— soluție de galactozo-dehidrogenază 25 U/ml (se utilizează preparat comercial de *Pseudomonas fluorescens* 5 mg proteină/ml).

— soluție acid percloric 1 M : se diluează 8,55 ml 70% sau 10 ml 60% pînă la un volum final de 100 ml.

Modul de lucru

În vederea deproteinizării 0,2 ml probă se tratează cu 4 ml soluție de acid percloric și se centrifughează la 3 000 t.p.m. timp de 5 minute. Supernatantul se neutralizează cu KOH 4 N, se lasă să stea 15 minute pe o baie de gheață, iar precipitatul de $KClO_4$ se îndepărtează tot prin centrifugare. Într-o cuvă de spectrofotometru, de cuarț, se pipetează 3 ml soluție tampon, 0,1 ml soluție NAD^+ și 0,2 ml supernatant. Se citește densitatea optică la 340 nm ($D.O_1$), apoi se adaugă 0,02 ml soluție de galactozo-dehidrogenază și se urmărește creșterea densității optice pînă aceasta atinge o valoare constantă — $D.O_2$.

Concentrația galactozei din probă, exprimată în μmoli/ml, se calculează utilizînd formula generală:

$$\frac{(D.O._2 - D.O._1) \times V}{\varepsilon \times d \times v} = \frac{(D.O._2 - D.O._1) \times 3{,}32}{6{,}22 \times 1 \times 0{,}02} = 2{,}67\ \Delta\ D.O.$$

unde V este volumul total al amestecului de reacție (3,32 ml)

v este volumul probei (0,02 ml).

ε este coeficientul de extincție cm^2 μmoli = 6,22

d este drumul optic, 1 cm

Valoarea obținută trebuie multiplicată cu un factor de diluție calculat pentru procesul de deproteinizare și neutralizare.

Preparatele de galactozo-dehidrogenază pot fi inactivate prin păstrarea la 0—4°C. Enzima poate fi reactivată cu 2-mercapeoetanol 0,1 M, la pH7 și la 30°C.

Experiența 126. PREPARAREA AMIDONULUI ȘI FRACȚIUNILOR LUI

Amidonul este extras din cartof prin spălare sub jet de apă și în final cu metanol. Fracționarea amidonului în amiloză și amilopectică se realizează pe baza diferențelor de solubilitate a celor două fracții.

Reactivi și soluții

— metanol
— alcool amilic primar
— KH_2PO_4
— K_2HPO_4

Modul de lucru

Cartofii descojiți și mărunțiți sînt macerați într-un omogenizator cu cuțite, timp de 5 minute, în prezența a 2—3 volume de apă distilată. Macerarea trebuie realizată la o turație moderată pentru a evita ruperea granulelor de amidon. Omogenatul este filtrat prin mai multe straturi de tifon, care în final sînt stoarse și amidonul spălat sub jet de apă. Pasta obținută este resuspendată în apă distilată și macerată încă 5 minute la omogenizator. Se repetă operația de filtrare prin straturile de tifon și stoarcerea puternică a acestora. Suspensiile de amidon sînt reunite și lăsate timp de o oră pentru sedimentarea polizaharidului. Amidonul de calitate superioară sedimentează cel mai rapid, deci se recomandă decantarea soluției cînd este încă tulbure. Sedimentul este reluat în 20 volume de apă distilată și suspensia este lăsată din nou să sedimenteze. Amidonul este separat prin decantarea soluției supernatante și este resuspendat în metanol, filtrat pe o pîlnie Büchner, spălat pe pîlnie cu metanol și uscat la 40—50°C.

În vederea fracționării amidonului, 30 g polizaharid sînt suspendate într-un amestec de 1,5 l apă distilată și 100 ml alcool amilic primar, apoi se adaugă 0,82 KH_2PO_4 și 0,18 g K_2HPO_4 pentru a obține un pH de 6,2—6,3. Amestecul obținut este plasat într-un balon de refluxare, la

care se adaptează condensatorul și un agitator de mare turație. Conținutul se agită energic pentru a realiza o suspensie uniformă a amidonului apoi se încălzește pe o baie de apă la fierbere sub continuă agitare. Amestecul este refluxat ușor timp de 3 ore, lăsat a se răci peste noapte și răcit la refrigerator 24 ore, în tot timpul acestor operațiuni menținîndu-se o agitare continuă.

Amiloza cristalizează ca niște aglomerări de ace sau sub forma unor sfere. Produsul este separat prin centrifugare la 50 000 r.p.m.

Pentru a separa amilopectina, supernatantul este tratat cu un volum egal de metanol și amestecul este refrigerat peste noapte. Masa precipitată este dezhidratată prin majorare timp de 2 minute într-un omogenizator cu cuțite, în prezență de metanol. Omogenatul este filtrat pe o pîlnie Büchner și uscat la 50°C.

Experiența 127. IZOLAREA GLICOGENULUI HEPATIC ȘI DOZAREA LUI

Glicogenul este izolat din ficatul unui șobolan ținut înfometat 48 ore înainteq sacrificării. Țesutul este dezintegrat prin refluxare la 100°C cu o soluție 30% de KOH, tratament care distruge proteinele și zaharurile reducătoare, dar care nu afectează semnificativ conținutul în glicogen. Polizaharidul este apoi precipitat cu etanol, precipitatul este hidrolizat cu acid, iar glucoza rezultată este dozată colorimetric cu reactiv dinitrosalicilic.

Reactivi și soluții

— soluție 30% de KOH
— etanol 95%
— soluție 0,6 M de HCl
— soluție 2 M de NaOH
— soluție 0,9% de NaCl
— soluție 0,1% de NaCl
— soluție standard de glucoză 1 mg/ml
— reactiv dinitrosalicilic : se dizolvă sub încălzire 10 g acid 3,5-dinierosalicilic în 200 ml NaOH 2 M. Se dizolvă 300 g tartrat dublu de sodiu și potasiu în aproximativ 500 ml apă și cele două soluții se amestecă sub agitare. Reactivul este diluat la un volum final de 1 000 ml.

Modul de lucru

După sacrificarea șobolanului, ficatul se suspendă în soluția NaCl 0,9% rece. Ficatul se scoate din soluția salină, se usucă pe hîrtie de filtru, se cîntărește, se mărunțește și se transferă într-un balon de refluxare, la care se adaugă cîte 2 ml KOH 30% pentru fiecare gram de țesut. Adăugarea soluției de hidroxid trebuie realizată cît mai rapid pentru a limita glicoliza. Se adaptează condensatorul și se refluxează pe o baie de apă la fierbere, pînă cînd țesutul este complet dezintegrat (30—40 minute).

Amestecul digerat este supus centrifugării la 5 000 r.p.m. timp de 5 minute. Se scot probe echivalente la 2 g țesut original, pentru fiecare ml se adaugă 1,2 ml etanol 95%. Se amestecă bine, se fixează condensatorul și se plasează pe baia de apă în fierbere. Cînd etanolul începe să fiarbă se îndepărtează condensatorul, se răcește balonul, iar amestecul

centrifugat. Glicogenul precipitat este separat şi se dizolvă în 2 ml soluţie 0,1% de NaCl. Se adaugă cîte 1 ml etanol 95% pentru fiecare ml de amestec digerat original, se amestecă şi se centrifughează din nou. Se aruncă supernatantul. Etanolul rezidual se elimină prin încălzire pe baie de apă la fierbere, 2 minute.

Hidroliza glicogenului izolat se realizează cu ml HCl 0,6 M, prin refluxare pe baie de apă la fierbere 2—3 ore. Se transferă cantitativ hidrolizatul într-un balon cotat de 25 ml. Se ajustează pH la valoarea 6 prin adiţie de NaOH 2 M şi se aduce la semn cu apă distilată.

Se prepară o curbă etalon pentru dozarea glucozei prin pipetare în 5 eprubete de 0—0,2 ml — 0,4 ml — 0,8 ml — 1 ml soluţie standard, care se aduc la un volum final de 1 ml cu apă distilată. Se pipetează în fiecare eprubetă cîte 2 ml reactiv dinitrosalicilic, se incubează pe baie de apă la fierbere timp de 5 minute. Probele se răcesc şi în fiecare se adaugă cîte 7 ml apă. Se citeşte densitatea optică la 540 nm a probelor 2—5 faţă de proba 1 (cu 1 ml apă) şi se trasează curba etalon.

Se repetă determinarea cu probe de 0,25 ml — 0,5 ml — 1 ml hidrolizat de glicogen care se aduc la un volum final de 1 ml. Probele sînt tratate cu reactiv dinitrosalicilic, similar cu soluţiile de glucoză de concentraţie cunoscută şi se citeşte densitatea optică la 540 nm. Din cele trei probe se alege citirea care se încadrează pe curba etalon şi prin extrapolare se află cantitatea de glucoză din 1 ml hidrolizat. Ţinînd seama de diluţiile făcute se calculează mg glucoză din 1 g ficat. Deoarece 162 părţi de glicogen şi 18 părţi de apă produc 180 părţi glucoză, valoarea obţinută trebuie multiplicată cu 162/180.

Deoarece 3% glicogen este distrus în timpul hidrolizei, valoarea obţinută trebuie multiplicată şi cu 0,03. În final rezultatele experimentale se exprimă ca g glicogen/100 g ficat.

Experienţa 128. HIDROLIZA ACIDĂ A GLICOGENULUI ŞI A ALTOR POLIZAHARIDE

Hidroliza acidă a legăturilor glucozidice α,1-4 şi α,1-6 din structura glicogenului are loc la întîmplare, rezultînd ca produşi intermediari o gamă largă de oligozaharide şi ca produs final glucoza. Alte polizaharide (celuloza, inulina, chitina) pot fi hidroliztee mai uşor sau mai greu decît glicogenul.

Reactivi şi soluţii

— polidaharide : glicogen, celuloză, inulină, chitină
— soluţie 2 M de HCl
— soluţie 4 M de NaOH
— un anionit slab
— reactiv dinitrosalicilic (v. Experienţa 127).

Modul de lucru

Se dizolvă 0,050 g glicogen în 10 ml apă şi se pipeteează cîte 1 ml soluţie într-o serie de 7 eprubete. În fiecare se mai adaugă 1 ml apă şi 2 ml soluţi HCl 2 M, eprubetele se astupă şi se incubează pe o baie de apă la fierbere. Hidroliza este stopată după 0—10—20—30—40—50—60 minute prin îndepărtarea succesivă a eprubetelor din baia de apă. După

neutralizarea probelor cu 1 ml NaOH 4 M, în fiecare eprubetă se determină zaharurile reducătoare totale cu reactiv dinitrosalicilic conform modului de lucru descris în Experiența 126. Pe măsură ce hidroliza a avansat noi grupări reducătoare au fost eliberate. Se schițează creșterea gradului de hidroliză acidă în timp.

Se repetă experimentul și cu polizaharide și se compară curbele care redau variația în timp a gradului de hidroliză.

De asemenea, se hidrolizează 2 ml soluție glicogen cu 2 ml HCl 2 M timp de o oră. După răcirea hidrolizatului, acesta se tratează cu o rășină schimbătoare de anioni, forma HO^-, utilizînd procedeul „batch" pînă cînd amestecul are un pH neutru. Se decantează supernatantul și se utilizează pentru o separare cromatografică (v. Experiența 132).

Experiența 129. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A GLICOGENULUI CU α ȘI β-AMILAZĂ

α-amilaza catalizează hidroliza legăturilor α-1,4 glucozidice din glicogen, neatacînd legăturile α-1,6 din același polizaharid, legăturile α-1,4 din maltoză sau legăturile β-1,4 din celuloză. Hidroliza are loc la întîmplare, produșii finali fiind în primul rînd maltoza și într-o proporție mai mică glucoza și maltotrioza. Creșterea numărului de grupări reducătoare în timpul hidrolizei este urmărită cu reactiv dinitrosalicilic, iar produșii finali sînt identificați cromatografic.

β-amilaza din plantele superioare catalizează hidroliza legăturilor α-1,4 de la capătul nereducător liber al polizaharidului, cu eliberarea succesivă de resturi de maltoză. Hidroliza încetează cînd enzima atinge un punct de ramificație. Produsul principal al hidrolizei este maltoza. Creșterea gradului de hidroliză este urmărită prin determinarea cantității de zaharuri reducătoare produse.

Reactivi și soluții

— α-amilază salivară
— β-amilază din plante
— glicogen
— tampon fosfat 0,1 M, pH 6,7 care conține NaCl 0,05 M
— reactiv dinitrosalicilic (v. Experiența 127).

Modul de lucru

Se dizolvă 0,050 g glicogen în soluție tampon fosfat—NaCl (10 ml) și se pipetează cîte 1 ml soluție în 7 eprubete. Se adaugă cîte 3 ml salivă diluată 1 : 100 cu apă și se incubează la 37°C timp de 0—10—20—30—40—50—60 minute. Se îndepărtează eprubetele la diferite intervale de timp din termostat se adaugă 1 ml apă și se stopează reacția prin pipetarea reactivului dinitrosalicilic și fierbere. Se reprezintă grafic cantitatea de zaharuri reducătoare determinată în diferite etape ale hidrolizei enzimatice cu α-amilază.

Se repetă experiența de hidroliză, însă cu un preparat de β-amilază, obținut dintr-o sursă vegetală prin simplă extracție. Se reprezintă grafic variația în timp a gradului de hidroliză și se compară cu schița obținută în experimentul cu α-amilază.

În vederea analizei cromatografice a produșilor hidrolizelor enzimatice cu α- și β-amilază, se incubează timp de 60 minute 6 ml enzimă și 2 ml soluție glicogen. Proba este desalefiată prin amestecare directă cu un anionit slab în forma OH^- și pentru cromatografie se utilizează supernatantul.

Experiența 130. SCINDAREA GLICOGENULUI CU FOSFORILAZA DIN MUȘCHI ȘI PRODUCEREA DE GLUCOZO 1-FOSFAT

Glicogenul este prezent în cantități mari în țesuturile hepatic și muscular ale unui animal bine hrănit. Între mese, acest polizaharid de rezervă este degradat pentru a furniza energie — prima etapă a acestei căi metabolice constînd din reacția catalizată de fosforilază :

$$(\text{Glucoza})_n + P_i \xrightarrow{\text{fosforilaza}} (\text{Glucoza})_{n-1} + \text{Glucozo-1-fosfat}$$

Enzima catalizează îndepărtarea succesivă a cîte unei molecule de glucoză de la capătul nereducător al substratului polizaharid, cu formarea de glucozo-1-fosfat cu fosfatul aonrganic. Este un proces de *fosforoliză* deoarece liza legăturii glucozidice are loc în prezența fosfatului. Amestecul de reacție conține cisteină pentru a proteja grupările SH ale enzimei și NaF care inhibă reacția fosfoglucomutazei care poate transforma glucozo-1-fosfatul în glucozo-6-fosfat. Se adaugă și AMP pentru că enzima există în două forme : fosforilaza *a* (activă) și fosforilaza *b* (mai puțin activă). Forma *b* este activă numai în prezență de AMP. Glucozo-1-fosfatul produs este izolat ca sare de bariu și fiind un semiacetal este ușor hidrolizat de un acid diluat la glucoză și fosfat. Reacția este completă la 100 C, după 10 minute.

Reactivi și soluții

— glicogen fosforilază 25 U
— soluție tampon β-glicerofosfat de sodiu 0,01 M, pH 6,8 ce conține cisteină 0,003 M și NaF 0,1 M.
— soluție substrat : glicogen 1,6% în tampon fosfat 0,26 M, pH 6,8 ce conține cisteină 0,006M, AMP 2 M și 0,2 M NaF.
— amilază
— soluție 20% de acetat de bariu
— soluție 1% roșu fenol în soluție apoasă de etanol
— soluție 2 M NaOH
— soluție 1 M de H_2SO_4
— etanol absolut
— glucozo-1-fosfat, soluție 0,001 M
— reactivi pentru dozarea fosfatului (metoda Fiske—Subbarow).
— reactivi pentru dozarea grupărilor reducătoare

Modul de lucru

Se amestecă 5 ml tampon β-glicerofosfat cu 5 ml soluție glicogen și se incubează 10 minute pe o baie de apă la 37°C pentru termoechilibrare. Reacția enzimatică, inițiată prin adăugare de 0,2 ml fosforilază este condusă timp de 30 minute la 37°C, după care este stopată prin incubare pe

o baie de apă în fierbere timp de 2 minute. După răcirea probei sub jet de apă, excesul de glicogen este îndepărtat prin tratarea probei cu 1 ml soluție amilază și incubare 30 minute la temperatura camerii.

Se adaugă 2 ml soluție Ba $(CH_3COO)_2$ 20%, 2 picături de indicator roșu fenol și soluție NaOH M pînă la apariția unei culori roz stabile. Precipitatul de fosfat de bariu este îndepărtat prin centrifugare, iar supernatantul este tratat cu un volum triplu de etanol absolut, amestecul fiind lăsat timp de 30 minute pe baie de gheață. În timp se formează precipitatul sării de bariu al glucozo-1-fosfatului, care se separă prin centrifugare.

Se dizolvă sarea de bariu în 5 ml apă distilată.

2 ml soluție sînt tratați cu 2 ml H_2SO_4 M și incubați pe o baie de apă la fierbere timp de 10 minute. După răcire amestecul se neutralizează cu 2 ml NaOH 2 M și se determină în supernatant concentrația în zahar reducător prin una din metodele descrise anterior și concentrația de ortofosfat prin metoda Fiske-Subbarow (v. Experiența 73).

Alți 2 ml soluție ester fosforic sînt tratați cu 2 ml H_2SO_4M și imediat (fără fierbere !) se adaugă 2 ml NaOH 2 M. Se determină de asemenea zaharul reducător și concentrația de ortofosfat din proba nehidrolizată. Se calculează cantitatea de glucozo-1-fosfat formată.

Se compară rezultatele cu acelea obținute după hidroliza acidă a unei soluții 0,001 M de glucozo-1-fosfat.

7.3. METODE DE SEPARARE A ZAHARURILOR

În această secțiune vom prezenta separarea zaharurilor pe coloane umplute cu cărbune, cu celuloză, pe hîrtie și pe straturi subțiri de celuloză.

Experiența 131. SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ A ZAHARURILOR PE COLOANE CU CĂRBUNE

Este prezentată metoda descrisă de Whistler și Durso în care oligozaharidele dintr-o soluție apoasă sînt adsorbite pe cărbune activat și desorbite selectiv cu soluții diluate de etanol.

Materiale și soluții

— cărbune activat
— Celită No. 535
— soluții 5%, 15%, 50% de etanol

Modul de lucru

Materialul cromatografic se prepară prin amestecarea a 60 g cărbune activat cu 120 g Celită, sub agitare viguroasă. Se adaugă apă distilată și se agită energic, pînă la obținerea unei suspensii fine omogene. Se împachetează coloana cu acest material cromatografic. Stratul cromatografic sedimentat este spălat cu aproximativ 1,5 l apă distilată, cu o viteză de scurgere de 10—20 ml/min. Un strat cromatografic cu un volum de aproximativ 400 ml va adsorbi 4 g oligozaharide.

Proba de analizat trebuie deproteinizată și pH ajustat la valoarea 7. După adsorbția completă în stratul cromatografic, coloana este spălată cu apă distilată. Primii 300 ml efluent, pot fi aruncați, după care se colectează fracții de cîte 10 ml pînă cînd se obțin probe cu un test calitativ pozitiv pentru zaharurile reducătoare. Monozaharidele și sărurile pot fi eluate complet cu 1,5—2 l apă distilată. Mersul eluției trebuie urmărit continuu prin testări calitative.

Cînd efluentul nu mai conține monozaharide, se îndepărtează stratul de apă de la suprafața coloanei și se începe eluția cu etanol 5%. Aproximativ 2 l etanol 5% sînt necesari pentru eluția completă a dizaharidelor. Acestea apar în efluent după aproximativ 400 ml colectați. Se colectează probe de 50 ml efluent și se testează prezența dizaharidelor. Cînd efluentul nu mai prezintă urme de dizaharide, concentrația în etanol din eluent este crescută la 15% pentru a desorbi trizaharidele, dacă sînt prezente. Se procedează similar, colectînd probe de cîte 50 ml și testînd calitativ prezența trizaharidelor.

În final coloana cromatografică este spălată cu aproximativ 2 l etanol 50% și apoi cu 2 l apă distilată pentru a putea fi reutilizată.

Fracția monozaharidelor trebuie deionizată prin trecere pe coloane schimbătroare de ioni, concentrată și analizttă din punct de vedere calitativ și al componentelor ei.

Fracțiile di- și trizaharidelor pot fi concentrate prin distilare în vacuum. Cristalizarea poate fi indusă prin adiție de etanol absolut, fierbinte și prin amestecare.

Experiența 132. SEPARAREA ZAHARURILOR PRIN CROMATOGRAFIE PE HÎRTIE

Crmatografia pe hîrtie este un exemplu de cromatografie de partiție lichid/lichid în care separarea este datorată repartiției diferențiate a substanțelor de separat între două faze lichide nemiscibile. Faza staționară constă dintr-un licihd care se leagă la un mediu poros, de exemplu 8—12% apă poate fi legată la celuloza din hîrtie. Cealaltă fază lichidă, denumită faza mobilă curge prin mediul poros fiind constituită dintr-un solvent organic parțial miscibil cu apa. Cînd faza mobilă trece prin suportul cromatografic care poartă amestecul de substanțe, are loc repartiția diferențială a componentelor între faza staționară apoasă și faza mobilă organică, corelată direct cu solubilitățile în cele două faze. Substanțele solubile în faza mobilă se deplasează mai rapid pe hîrtia cromatografică, în timp ce compușii acvosolubili, avînd o mai mare afinitate pentru faza staționară, se deplasează mai lent.

Cromatografia pe hîrtie poate fi utilizată numai pentru separarea substanțelor care sînt solubile sau parțial solubile în apă, iar faza mobilă trebuie să constituie un lichid în care compușii de separat sînt solubili sau parțial solubili. Migrarea substanțelor are loc numai dacă mediul poros se află într-o atmosferă saturată în solvent, realizabilă în tancuri cromatografice, închise etanș.

În cadrul procedeului de separare, substanța sau amestecul multicomponent este aplicat într-un spot la baza unei coale de hîrtie cromatografică, în poziția de „start". Faza mobilă curge antrenînd substanțele din

spot fie ascendent prin sucțiune capilară, fie descendent prin gravitate. Compușii sînt caracterizați prin vizitele lor relative de curgere, raportate la frontul solventului, prin valoarea R_f:

$$R_f = \frac{\text{distanța parcursă de substanță}}{\text{distanța parcursă de solvent}}$$

Valoarea R_f este o constantă pentru o anumită substanță, în separări cromatografice succesive, cu condiția menținerii acelorași condiții experimentale: hîrtia cromatografică, amestecul solvent care constituie faza mobilă, temperatura, pH, presiunea, sensul de migrare ascendent sau descendent etc. Teoretic, o substanță necunoscută poate fi identificată după valoarea R_f sau mai bine după valorile R_f în două sisteme solvent. Cu toate acestea avînd în vedere numărul mare de variabile se recomandă ca migrarea să fie efectuată în prezența unor standarde.

Separarea unui amestec de substanțe colorate (caroteni, clorofile etc.) poate fi ușor urmărită în timpul developării cromatogramei. Dacă substanțele sînt incolore, după ce cromatograma a fost developată, ele trebuie să fie detectate printr-o reacție chimică soldată cu formarea unui produs colorat.

Cromatografia pe hîrtie poate fi utilzată atît pentru studii calitative cît și pentru studii cantitative. O cantitate cunoscută dintr-un amestec este pusă în start cu o micropipetă; după ce cromatograma a fost developată, spoturile individuale sînt eluate de pe hîrtie și dozate separat.

Materiale și soluții

— soluții standard 1% de zaharuri: glucoză, maltoză, galactoză, fructoză, lactoză și zaharoză (pentru solvenții pe bază de fenol și de butanol, prepararea acestor soluții se realizează în apă saturată cu fenol);

— hîrtie Whatman No. 1;

— lapte degresat;

— soluție 10% de tungstat de sodiu;

— soluție H_2SO_4 1/3 M;

— solvenți: *soluție apoasă de fenol:* se toarnă 375 ml apă în 1 kg fenol, care se dizolvă prin încălzire pe o baie de apă la fierbere,

amestec butanol-etanol-apă (52 : 32 : 16),

amestec butanol-acid acetic-apă (52 : 13 : 35), dacă amestecul nu este omogen după agitare, poate fi obținută o singură fază prin adiția unei mici cantități de acid glacial.

amestec acetat de etil-acid acetic-apă (3 : 1 : 3) este utilizat numai stratul superior.

— reactiv indicator cu p-anisidină: se dizolvă 1 g p-anisidină. HCl în 100 ml n-butanol. Este folosit pentru detectarea zaharurilor reductoare și a glicozizilor acidolabili. Pentozele și cetoheptozele sînt colorate în roșu, cetohexozele și metil pentozele — în galben și aldohexozele — în brun.

— reactiv indicator cu m-fenilen diamină: se dizolvă 0,2 g m-fenilen diamină. 2 ml HCl și 2 acid oxalic în 100 ml etanol 80%. Reactivul colorează zaharurile reducătoare similar cu p-anisidina, în plus spoturile manifestă o fluorescență marcantă în lumină UV.

— reactiv indicator cu ftalat de anilină : se dizolvă 1 g ftalat acid de anilină în 100 ml n-butanol. Reactivul este deosebit de sensibil pentru acizii uronici şi pentoze.

— reactiv indicator cu orcinol : se dizolvă 0,5 g orcinol şi 15 g acid tricloracetic în 100 ml apă saturată cu butanol. Se obţine un reactiv sensibil pentru cetoheptoze.

Modul de lucru

Pot fi realizate separări cromatografice satisfăcătoare cu soluţii conţinînd pe lîngă zaharuri cantităţi mari de proteine şi săruri. Dacă însă zonele cromatografice sînt distorsionate sau dacă substanţele rămîn în strat se recomandă trecerea soluţiei peste coloane mici umplute cu schimbători de ionii aranjate una sub alta : Dowex 50, urmată de Duolite A 4. Soluţiile neutre sînt concentrate sub presiune redusă şi sînt aplicate în start.

Se plasează în tancul cromatografic amestecul solvent şi se lasă 30 minute pentru saturarea atmosferei în vaporii fazei mobile.

La 2 ml lapte degresat se adaugă 4 ml soluţie 10% de tungstat de sodiu, apoi încet, sub agitare se adaugă 4 ml soluţie 1/3 M de H_2SO_4. După 5 minute amestecul se filtrează pe o hîrtie Whatman No 42. La 2 ml filtrat se adaugă 0,5 ml HCl 2 M şi se încălzeşte pe o baie de apă la fierbere, timp de 15 minute. Se răceşte şi se neutralizează pînă la pH 7 utilizînd o soluţie de NaOH 2 M.

Pe o hîrtie Whatman No 1, de dimensiuni 30×30 cm se trasează la 3 cm de la bază o linie şi se marchează nouă puncte de strat (1—9) la distanţe de 2,5 cm între ele. În punctele 1—6 se aplică cu ajutorul unei pipete Pasteur, cîte trei picături din soluţiile de glucoză, maltoză, galactoză, lactoză, fructoză ş zaharoză. În spotul 7 se pun trei picături de lapte deproteinizat. În spoturile 8 şi 9 se pipetează cîte trei picături de zahăr hidrolizat şi de lapte deproteinizat hidrolizat.

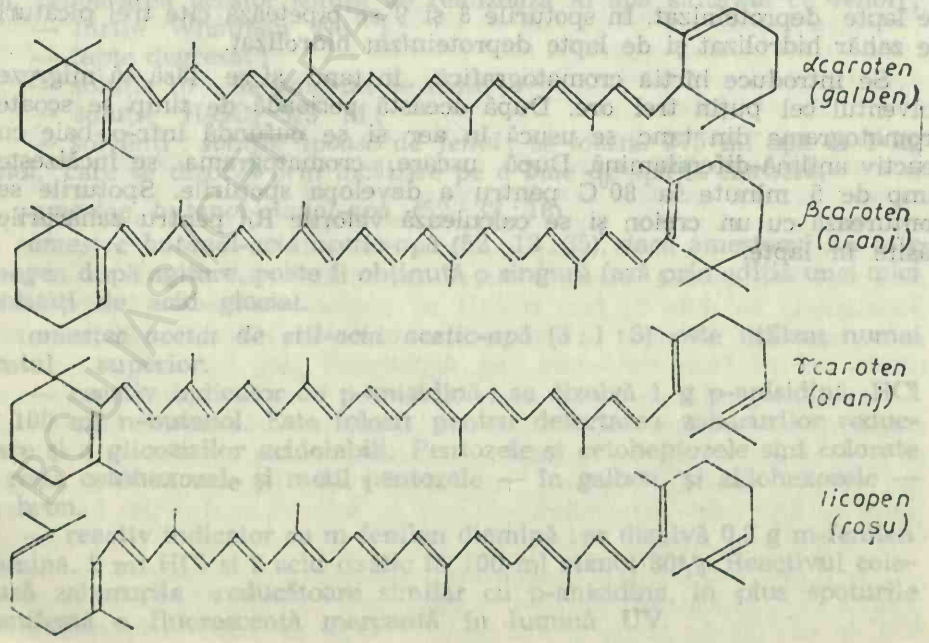
Se introduce hîrtia cromatografică în tanc şi se lasă să migreze solventul cel puţin trei ore. După această perioadă de timp se scoate cromatograma din tanc, se usucă în aer şi se cufundă într-o baie cu reactiv anilină-difenilamină. După uscare, cromatograma se încălzeşte timp de 5 minute la 80°C pentru a developa spoturile. Spoturile se conturează cu un creion şi se calculează valorile R_f pentru zaharurile găsite în lapte.

CAPITOLUL VIII

LIPIDE

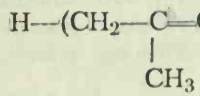
Termenul de lipide defineşte acele substanţe care sînt insolubile în apă, fiind solubile în solvenţi organici (cloroform, eter etilic, benzen) datorită faptului că au în structură grupări cu caracter hidrofob, de regulă catene hidrocarbonate lungi. Din această clasă de biomolecule face parte o gamă largă de compuşi prezenţi în organismele vii : hidrocarburi cu mulţi atomi de carbon, alcooli, aldehide, acizi graşi, gliceride, ceruri, fosfolipide, glicolipide, sulfolipide, vitaminele A, D, E, K şi derivaţii lor, carotenoizii, steroli şi esterii lor cu acizii graşi etc. În continuare vom prezenta structurile principalilor compuşi cu interes biochimic şi denumirile lor conform recomandărilor pentru nomenclatura biochimică ale Uniunii Internaţionale de Biochimie, de pe lîngă I.U.P.A.C.

(i) Dintre lipidele cu structură de *hidrocarburi*, constituite din catene de diferite lungimi, normale sau ramificate, saturate sau nesa-

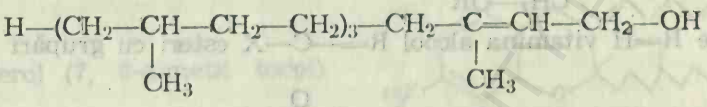


turate — carotenoizii sînt cei mai răspîndiți, atît în regnul vegetal cît și în acel animal.

(ii) *Alcolii* existenți în organismele vii pot apare atît în formă liberă cît și în stare esterificată sau eterificată. Dintre aceștia, *geraniolul* are n = 2, iar *farnesolul* n = 3.

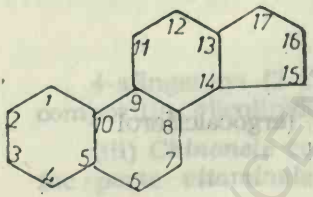


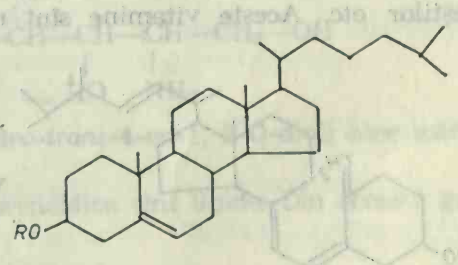
fiind alcooli izoprenoidici care se găsesc în numeroase surse vegetale. În structura vitaminei K_2 există un radical difarnesil. Un terpenol parțial saturat este *fitolul*



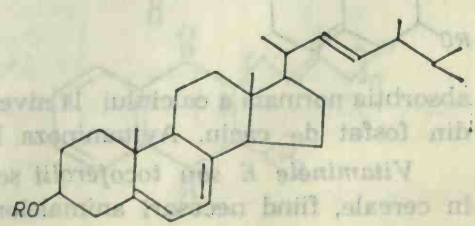
3, 7, 11, 15 — tetrametilhexadec-2-en-1-ol
care face parte din structura clorofilelor.

Sterolii și derivații lor sînt compuși larg distribuiți în lumea vie, fiind solubili în majoritatea solvenților lipidici, majoritatea nefiind saponifiabili. Sînt înglobați în clasa lipidelor datorită caracteristicilor lor similare de solubilitate. Toți sterolii au ca stuructură de bază ciclul *perhidrociclopentanofenantern*. Dintre acești compuși cel mai des întîlniți sînt :





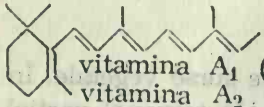
colest-5-en-3 β-ol R=H (colesterol)
3-O-acil-colest-5-en-3 ß-ol R=X—C(=O)—
(esteri ai colesterolului X=C_{12}—C_{10})



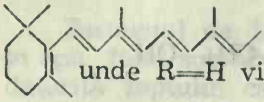
ergosta-5, 7, 22-trien-3 β-ol R=H
(ergosterol)
2-O-acil-ergosta-5, 7, 22-trien-3 β-ol
R=X—CO—
(esteri ergosterolului X=C_{12}—C_{20})

Colesterolul este compusul steroidic cel mai răspîndit, servind și ca un precursor important al altor metaboliți. *Acizii biliari :* acidul colic, acidul deoxicolic — implicați în digestia și absorbția lipidelor, *aldosteronul* — hormon al cortextului adrenalei care reglează echilibrul apei și al electroliților la mamifere, hormonii sexuali — sînt biosintetizați din colesterol.

Vitaminele liposolubile și esterii lor sînt alte componente ale clasei lipidelor. Astfel, cele două *vitamine A*



vitamina A_1 (retinolul)
vitamina A_2 (dehidroretinolul)



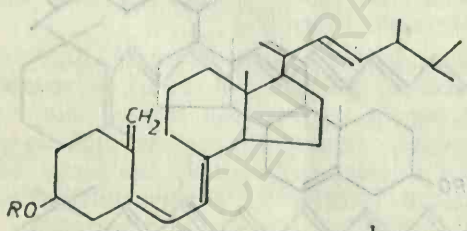
unde R=H vitamina alcool R=—C—X esteri cu grupări

O

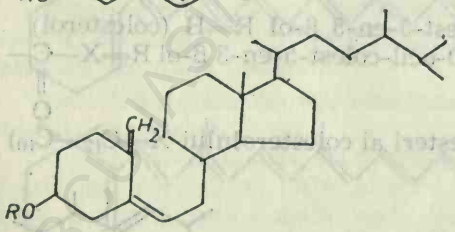
acil (C_{12}—C_{20}) staturate sau nesaturate.

și esterii lor se găsesc în diferite plante, produse lactate, în țesutul hepatic al peștilor etc. Avitaminoza A este caracterizată printr-o vedere defectuoasă la întuneric și chiar prin orbire. Vitaminele A sînt de asemenea necesare pentru menținerea unui epiteliu normal, pentru formarea oaselor, dinților etc.

Vitaminele D și esterii lor se găsesc în produsele lactate, în ficatul peștilor etc. Aceste vitamine sînt necesare pentru :



vitamina D_2 (ergocalciferol



Vitamina D_3 (colecalciferol
unde R=H vitamina alcool
R=—C—X esteri cu grupări

O

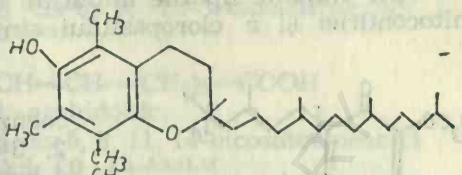
acil (C_{12}—C_{20}) saturate sau nesaturate.

absorbția normală a calciului la nivelul intestinului și la formarea oaselor din fosfat de caciu. Avitaminoza D este cauza rahitismului la copii.

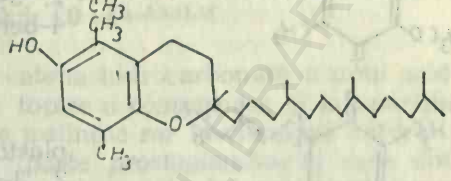
Vitaminele E sau tocoferolii se găsesc în plantele verzi, în special în cereale, fiind necesari animalelor (nu omului) pentru o reproducere

normală. Ei probabil acționează ca antioxidanți, protejînd constituienții celulari față de diferiți agenți oxidanți.

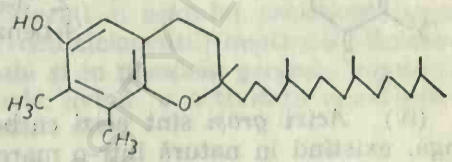
α-tocoferol (5, 7, 8-trimetil tocol)



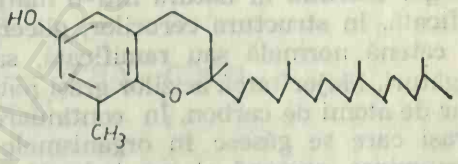
β-tocoferol (5, 8-dimetil tocol)



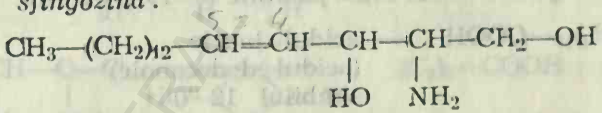
γ-tocoferol (7, 8-dimetil tocol)



δ-tocoferol (8-metil tocol)



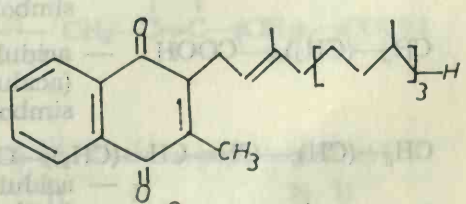
Dintre *amino alcoolii* înglobați în clasa lipidelor, principalul reprezentant este *sfingozina*:



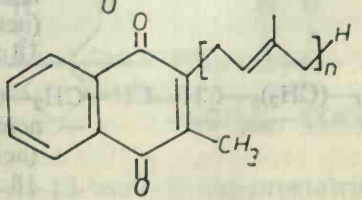
4-sfingenina (2 D-aminooctadec-*trans*-4-en-1, 3-D-diol) care intră în compoziția glicolipidelor.

(iii) *Chinonele* cu catene izoprenoidice sînt lipide. Din această grupă fac parte *vitaminele K*,

vitamina K_1 sau filochinona
2-metil-3-fitil-1, 4-naftochinona

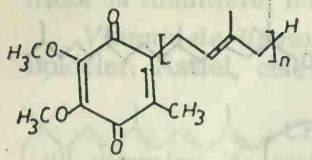


vitamina K_2 sau menachinona
2-metil-3-multiprenil-1,
4-naftochinona
(n = 6—10)

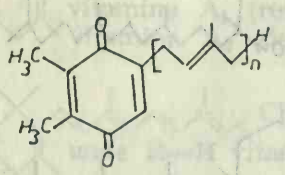


care se găsesc în special în plantele verzi. Unele forme ale vitaminelor K sînt necesare pentru coagularea normală a sîngelui.

Alte chinone lipofile implicate în transferuri de electroni la nivelul mitocondriei și a cloropastului sînt :



coenzima Q sau ubichinona
2, 3-dimetoxi-5-metil-6-multiprenil-1,
4-benzochinona (n=6—10)



plastochinona
2, 3-dimetil-6-multiprenil-1,
4-benzochinona (n=6—9)

(iv) *Acizi grași* sînt acizi carboxilici cu o catenă hidrocarbonată lungă, existînd în natură într-o mare varietate, în stare liberă sau esterificată, în structura cerurilor, gliceridelor, fosfatidelor etc. Ei pot avea o catenă normală sau ramificată, saturată sau cu un număr de duble legături. Majoritatea acizilor grași naturali au catene lineare cu un număr par de atomi de carbon. În continuare vom prezenta cei mai comuni acizi grași care se găsesc în organismele vii, indicînd formula moleculară, denumirea comună și cea indicată a IUPAC, precum și simbolul. De exemplu, acidul linoleic are simbolul $18 : 2\Delta^{9,12}$ deci conține 18 atomi de carbon și două legături duble între pozițiile 9—10 și 12—13.

$CH_3—(CH_2)_{10}—COOH$ — acidul lauric
(acidul dodecanoic)
simbilul 12 :0

$CH_3—(CH_2)_{12}—COOH$ — acidul miristic
(acidul tetradecanoic)
simbolul 14 : 0

$CH_3—(CH_2)_{14}—COOH$ — acidul palmitic (acidul hexadecanoic)
simbolul 16 : 0

$CH_3—(CH_2)_{16}—COOH$ — acidul stearic
(acidul octadecanoic)
simbolul 18 : 0

$CH_3—(CH)_7—CH=CH—(CH_2)_7—COOH$
— acidul oleic
(acidul cis-9-octadecenoic)
$18 : 1\Delta^{9}$

$CH_3—(CH_2)_4—CH=CH—CH_2—CH=CH—(CH_2)_7—COOH$
— acidul linoleic
(acidul cis, cis 9, 12-octadienoic)
$18 : 2\Delta^{9,12}$

$CH_3—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—(CH_2)_7—COOH$

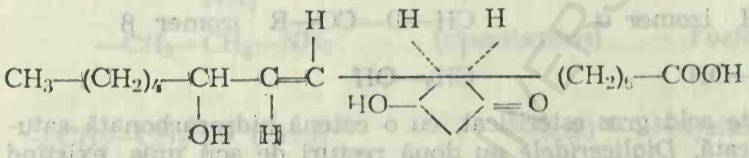
— acidul γ-linolenic
(acidul cis-6, 9, 12-octadecatrienoic)
$18 : 3\Delta^{6,9,12}$

$CH_3—(CH_2)_4—(CH=CH—CH_2)_3—CH=CH—(CH_2)_3—COOH$

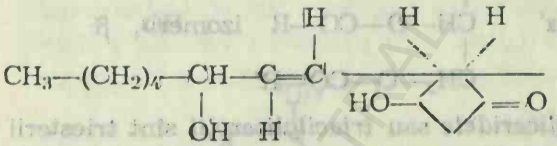
— acidul arahidonic
(acidul cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic)
simbolul $20 : 4\Delta^{5,8,11,14}$

Introducerea de duble legături în catena hidrocarbonată a unui acid gras conduce la scăderea punctului de topire a compusului și la apariția de izomeri *cis* și *trans*. Formele *trans* se întîlnesc rar în compușii naturali.

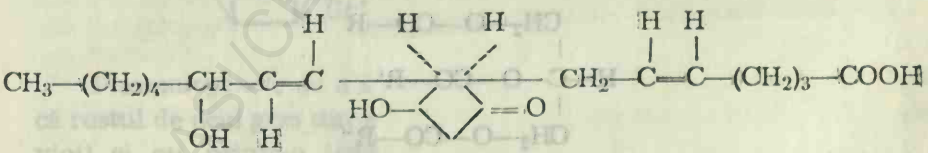
Tot din clasa acizilor grași fac parte *prostaglandinele*, care sînt derivați hidroxi- sau cetohidroxi- nesaturați ai *acidului prostanoic* care are denumirea științifică de acid 7-(2'-octilciclopentil)-heptanoic. Prostaglandinele se găsesc în plasma seminală și în glandele genitale accesorii și acționează asupra musculaturii netede, avînd o activitate vasodepresoare. Principalele tipuri de prostaglandine sînt :



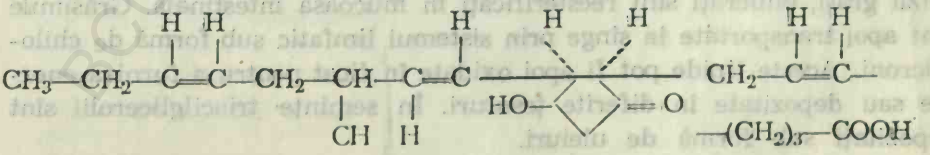
Prostaglandina E_1
(acidul 11 α, 15 (S) -dihidroxi-9-oxo-13-trans-prostenoic



Prostaglandina $F_1\alpha$
(acidul 9α, 11α, 15(S) -trihidroxi-13-trans-prostenoic)



Prostaglandina E_2
(acidul 11α, 12(S) -dihidroxi-9-oxo-5-cis-13-trans-prostadienoic)



Prostaglandin E_3
(acidul 11α, 15(S)-dihidroxi-9-oxo-5-cis-13-trans-17-cis-prostatrienic)

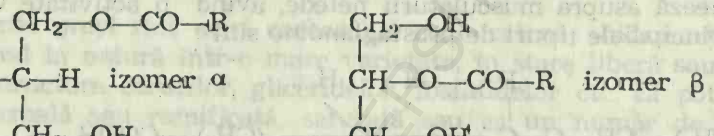
(v) *Cerurile* sînt esteri ai acizilor graşi cu alcolii superiori ce apar la suprafaţa pielii animalelor, în cuticula frunzelor şi la anumite bacterii. *Cerurile simple* sînt monesteri ai acizilor graşi cu alcooli primari

$$CH_3—(CH_2)_n—CO—O—CH_2—(CH_2)_m—CH_3$$

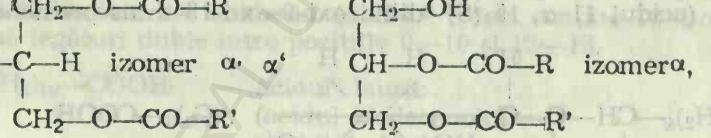
unde *n* şi *m* au valori mai mari de 8—18

Cerurile complexe au în structura lor, fie restul acid, fie restul alcool, fie ambele componente cu catene hidrocarbonate ramificate sau cu derivaţi funcţionali. Aceşti compuşi constituie un material de protejare a celulelor faţă de agenţi mecanici, contra infecţiilor şi reţinerii excesive de apă.

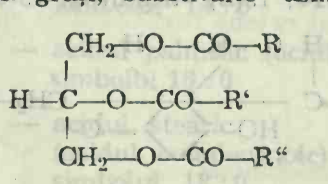
(vi) *Acil glicerolii* sau *gliceridele* fac parte din categoria grăsimilor neutre fiind esteri ai acizilor graşi cu glicerolul. Ele sînt solide (grăsimi) sau lichide (uleiuri) în funcţie de conţinutul lor în resturi de acizi graşi saturaţi şi respectiv nesaturaţi. *Monogliceridele* conţin în structura lor



un singur rest de acid gras esterificat, cu o catenă hidrocarbonată saturată sau nesaturată. *Digliceridele* au două resturi de acil gras, existînd



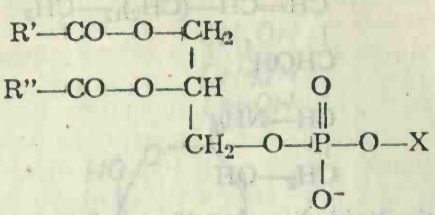
doi izomeri : α, α' şi α, β. *Trigliceridele* sau *triacilglicerolii* sînt triesterii glicerolului cu acizi graşi. În natură, aceşti compuşi conţin cel puţin două resturi diferite de acizi graşi, substituite asimetric. Triacilglicerolii



ingurgitaţi cu hrana sînt parţial degradaţi de lipaza din intestin, apoi acizii graşi, eliberaţi sînt reesterificaţi în mucoasa intestinală. Grăsimile sînt apoi transportate la sînge prin sistemul limfatic sub formă de chilomicroni. Aceste lipide pot fi apoi oxidate în ficat pentru a furniza energie sau depozitate în diferite ţesuturi. În seminţe triacilglicerolii sînt depozitaţi sub formă de uleiuri.

(vii) *Fosfolipidele (fisfatidele)* sînt lipide complexe ce pot fi clasificate în două mari grupe : *glicerofosfatide* şi *sfingozilfosfatide*. Reprezen-

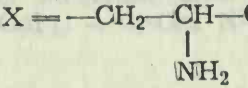
tanții primei grupe sînt derivați ai acidului fosfatidic (1, 2-diacil-sn-glicerol-3-fosfat) :



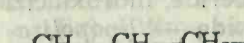
unde X = H

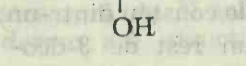
R', R'' — resturi de acizi grași, saturați și nesaturați.

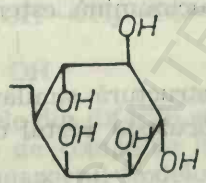
În glicerofosfatide, X poate fi un aminoalcool sau un polialcool :


(serina) — *Fosfatidil serina*

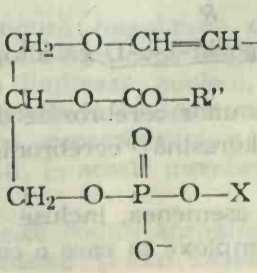
(etanolamina) — *Fosfatidil etanolamina* (cefalina)


(colina) — *Fosfatidil colina* (lecitina)

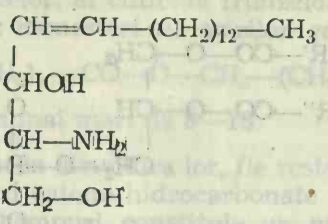

(glicerol) — Fosfatidil glicerol


(inozitol) — *Fosfatidil inozitol*

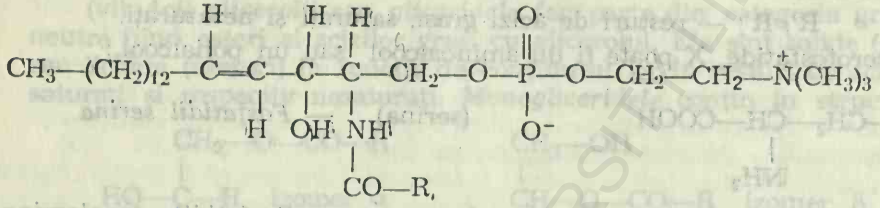
Plasmalogenele au o structură similară glicerofosfatidelor cu excepția că restul de acid gras din poziția C_2 sau C_3 este legat printr-o punte eterică vinil și nu printr-o legătură esterică.



Sfingozilfosfatidele au în structura lor în locul glicerolului restul unui aminoalcool — sfingozina :



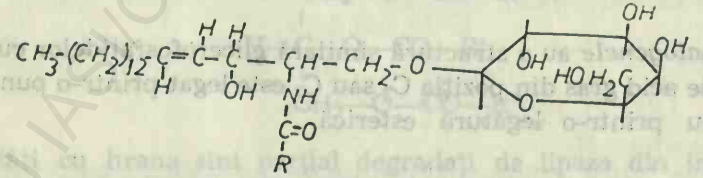
Cel mai reprezentativ lipid din această grupă este *sfingomielina*, esterul fosforilcolinei cu un derivat N-acil al sfingozinei (ceramida) :



N-acil-trans-4-sfingenina-1-fosforil colina

(viii) *Glicolipidele* sînt compuși care conțin atît o parte glucidică (resturi de glucoză, trehaloză, glucozamină, inozitol, galactoză, arabinoză, fucoză, manoză etc.) cît și o parte lipidică (resturi de gliceride, hidroxiacizi grași, acizi grași, fosfatide, steroli etc.). Dintre glicolipide — *lipopolizaharidele* sînt complexe polizaharid-lipide cu mase moleculare mari ce există în pereții celulari ai bacteriilor Gram-negative. Ele constau dintr-un polizaharid legat la un glicolipid („lipid A") printr-un rest de 3-deoxioctulozonat. Lipidul A este o poli-N-acil-glucozamină esterificată cu etanolamin fosfat și cu acizi grași.

Cerebrozidele sînt niște glicolipide cu o structură similară sfingomielinei, cu excepția faptului că galactoza înlocuiește restul de fosforil

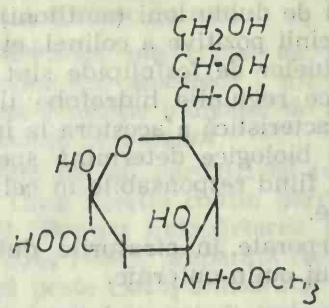


N-acil-sfingozin-1-α-D-galactopiranozid

colină. Prezentăm structura unor cerebrozide din creier, unde R—CO— sînt resturi lignoceril (în kerasină), cerebronil (în frenosină), nervonil (în nervonă) etc.

Gangliozidele sînt, de asemenea, incluse în clasa glicolipidelor. Acestea sînt cerebrozile complexe în care o catenă oligozaharidică ce

conține acid N-acetil neuraminic este legată la gruparea alcool primar a sfingozinei. În continuare vom prezenta structura *acidului sialic* :



și structura unui gangliozid de bază :

Gal (1 → 3)-Gal N-acetil (1 → 4)-Gal (1 → 4)-Glu (1 → 1')-ceramid

2 — | → 3

N-acetil neuraminat

Gangliozidele apar în cantități mari în creier, în membranele eritrocitare precum și în alte organe.

(ix) Ultima clasă de lipide este cea a *lipidelor care conțin aminoacizi.* Astfel, peptidolipidele apar în unele specii de bacterii, avînd o structură de N-acil oligopeptide. De exemplu, glipopeptidul din *Mycoderma* are structura :

$C_{25}H_{51}$—CH(OH)—CH_2—CO—Phe-allo Thr-Ala-alaninol-O-Me_3 ramnoza

O—(Ac-6-deoxitaloza)

Lipidele din diferite surse bioligice sînt frecvent asociate cu proteine, sub formă de complexe lipoproteice. Lipoproteinele solubile sînt implicate în transportul lipdelor în sînge, în timp ce lipoproteinele insolubile constituie componenta principală a membranelor biologice (reticul endoplasmatic, lamelele cloroplastelor, cristele mitocondriilor) și a tecii mielinice a nervilor.

Membranele biologice

Procariotele au o singură membrană care protejează conținutul celular, în timp ce eucariotele conțin pe lîngă membrana celulară și alte sisteme membranare care limitează nucleul, mitocondria și lizozomul. Aceste membrane împart celula în compartimente caracterizate prin secvențe metabolice specifice, reprezentînd o barieră de permeabilitate pentru o serie de metaboliți. În aceste membrane se găsesc multe enzime și sisteme transport.

Majoritatea membranelor conțin aproximativ 40% lipide, 60% proteine — precum și unele zaharuri și ioni. Lipidele prezente în membranele

biologice constau în principal din molecule de fosfolipide, asociate într-o manieră regulată, creînd atît regiuni hidrofobe cît și regiuni hidrofile — deci sînt *molecule amfipatice*. De asemenea, majoritatea fosfolipidelor membranare au structuri de dublu ioni (amfiioni) datorită sarcinii negative a părții fosfat și sarcinii pozitive a colinei, etanolaminei, serinei etc. Părțile polare ale moleculelor de fosfolipide sînt hidrofile și interacționează cu apa, în timp ce regiunile hidrofobe tind să se autoasocieze, avînd loc o orientare caracteristică a acestora la interfața aer-apă. Glicolipidele din membranele biologice determină specificitatea imunologică a celulelor, a țesuturilor, fiind responsabile în cel mai mare grad pentru sarcina suprafeței celulare.

Proteinele sînt incorporate în straturile duble ale lipidelor, fiind integrate mai mult sau mai puțin puternic.

8.1. PURIFICAREA SOLVENȚILOR UTILIZAȚI ÎN STUDIUL LIPIDELOR

Datorită faptului că lipidele suferă ușor reacții de peroxidare și de degradare hidrolitică este necesar ca solvenții utilizați în cercetările de lipidologie să fie purificați în prealabil. Prezența uonr agenți contaminanți poate fi ușor detectată prin cromatografie în strat subțire, prin gaz cromatografie sau prin spectrofotometrie în vizibil, ultraviolet și infraroșu.

Pentru a evita contaminarea solvenților organic se recomandă utilizarea unor solvenți de puritate analitică, distilarea lor înaintea utilizării și îndepărtarea a cel puțin 10% din cantitatea lor (capul și coada distilatului) precum și păstrarea lor în containere de sticlă de culoare brună. Următorii solvenți nu necesită decît o distilare simplă înaintea utilizării, fiind stabili apoi cîteva luni : benzenul, toluenul, tetraclorura de carbon, acetatul de etil și acetona.

În timpul păstrării unii solvenți suferă modificări chimice. Astfel, alcoolii primari suferă reacții de oxidare, soldate cu formarea de aldehide care interacționează cu grupările amino, hidroxil sau cu grupările metilen activitate. În cloroform și diclormetan se formează fosgen ($COCl_2$) care poate interacționa cu grupările hidroxil și amino. În alchil eteri și în eterul de petrol * se dezvoltă peroxizi care peroxidează dublele legături.

În continuare vom prezenta cîteva modalități de îndepărtare a contaminanților din solvenții organici utilizați în aceste studii.

Alcoolii. Aldehidele și peroxizii din metanol, etanol, n-propanol, izopropanol pot fi îndepărtați prin distilare peste granule de KOH. Distilatele trebuie păstrate în sticle brune, nu mai mult de 1—2 luni.

Solvenții clorurați. Pentru îndepărtarea fosgenului, se recomandă spălarea acestor solvenți cu apă, apoi uscarea pe $CaCl_2$ anhidră și distilarea.

* Termenul „eter de petrol" se referă la un amestec de hidrocarburi cu puncte de fierbere scăzut, obținute prin distilarea petrolului Pe ambalaje sînt indicate și domeniile de fierbere (p. f — 30—60°C) și (60—80°C). Termenul de „Lingroin" este utilizat pentru fracțiile care fierb peste 100°C.

Cînd solventul nu trebuie să conțină nici urme de fosfogen se recomandă tratarea cu metanol sau etanol 1% — care inhibă producerea ulterioară de fosgen. Cloroformul proaspăt, cu grad de reactiv, care nu conține încă fosgen poate fi distilat, fără spălare cu apă.

Alchil eterii, hidrocarburile sau eterul de petrol. În acest caz se testează prezența peroxizilor : se amestecă 2 ml solvent cu 1 ml soluție KI 10% și o picătură dintr-o soluție indicator de amidon — apariția unei culori albastre indică prezența peroxizilor.

Dacă solvenții organici nu au peroxizi se recomandă utilizarea lor după o distilare simplă. Dacă aceștia conțin peroxizi este indicată îndepărtarea lor în prealabil. Pentru îndepărtarea peroxizilor se amestecă solventul cu o soluție de 20% $FeSO_4$ preparată H_2SO_4N (100 ml/litru) și cu 100 ml apă, apoi se usucă peste $CaCl_2$ anhidră și se distilă. În cazul particular al eterului etilic, peroxizii pot fi îndepărtați prin tratarea cu $LiAlH_4$ (5—10 g/100 ml), refluxare 1—2 ore și apoi distilare. Dioxanul și tetrahidrofuranul care formează peroxizi în timpul păstrării sînt de asemenea purificați prin adăugare cu grije, lent de $LiAlH_4$ (10 g/100 ml), refluxare 1—2 ore și apoi distilare.

8.2. PROCEDEE DE EXTRACȚIE A LIPIDELOR

Un procedeu de extracței a lipidelor trebuie să permită o solubilizare cantitativă a lipidelor celulare într-o stare nedegradată, extractele nu trebuie să fie contaminate cu alte componente : zaharuri, aminoacizi, etc. Oportunitatea aplicării unui anumit procedeu de extracție a lipidelor dintr-o anumită sursă biologică depinde de natura asociațiilor pe care acestea le stabilesc în celulă. Kates (1975) consideră că există trei tipuri de asociații la care lipidele participă :

(i) *asociați Van der Waals sau hidrofobe* în care lipidele neutre sau nepolare interacționează prin catenele lor hidrocarbonate cu alte lipide sau cu părțile hidrofobe ale proteinelor, stabilind legături necovalente, care se găsesc în țesutul adipos, în chilomicroni, în complexele albumină-acizi grași etc.

(ii) *asociații constituite prin legături de hidrogen, interacții electrostatice și de tip hidrofab* care se găsesc în membranele plasmatice, în mitocondrii, reticul endoplasmic și lipoproteine serice — stabilite în special între lipidele polare și proteine.

(iii) *asociații covalente* care apar în lipopolizaharidele pereților celulelor bacteriene și sînt stabilite între acizi grași și partea polizaharidică (legături esterice, amidice, glicozidice).

Lipidele din asociațiile hidrofobe, pot fi extrase cu solvenți relativ nepolari : eter etilic, cloroform sau benzen. Lipidele din membrane pot fi extrase cu solvenți polari : etanol sau metanol, care rup legăturile de hidrogen și interacțiile de tip electrostatic stabilite între lipide și proteine. Lipidele din asociațiile covalente trebuie mai întîi scindate din complex prin hidroliză acidă sau alcalină și apoi extrase într-un solvent adecvat.

În alegerea procedeului de extracție trebuie luată în considerare și natura chimică a lipidelor. Astfel, de exemplu, în cazul lipidelor cu grad înalt de nesaturare, extracția se realizează sub azot, solvenții utilizați fiind anterior dezaerați prin barbotare cu azot. Temperatura extracției nu trebuie să depășească valoarea temperaturii camerei pentru a întîrzia reacțiile de peroxidare și de hidroliză. Procedeele vechi care utilizează extractoare Soxhlet și refluxarea solventului mai multe ore trebuie evitate. În final, extractul lipidic nu trebuie uscat la sec și lăsat în această situație o perioadă mai lungă de timp, ci trebuie reluat rapid într-un solvent convenabil.

În special în cazul procedeelor de extracție a lipidelor din materiale vegetale un factor care trebuie luat în considerație este degradarea enzimatică datorată fosfatidazelor și lipazelor. Pentru a evita efectele nedorite ale acțiunii acestor enzime se recomandă utilizarea unor amestecuri de solvenți care conțin alcool, ce le inactivează. În cazul enzimelor mult mai stabile (fosfolipaza *D* din frunzele verzi) se impune imersarea țesutului în alcool fierbinte sau în apă la fierbere, timp de 1—2 minute, pentru a le inactiva.

Deci alcoolul ca parte a unui amestec de solvenți de extracție poate realiza disocierea complexelor lipide-proteine, dizolvînd lipidele și poate inactiva hidrolazele degradative. Cu toate acestea acțiunea lui este limitată de faptul că extrage concomitent și zaharuri, aminoacizi, etc. În acest caz se impune îndepărtarea ulterioară a contaminanților solubili în apă din extractul lipidic brut. Folch și colab. (1957) propun utilizarea unui sistem solvent cloroform-metanol-apă (1 : 2 : 0,8 v/v) care extrage rapid și eficient lipidele ; extractul este apoi diluat cu un volum de cloroform (sau cu un volum de apă), cînd se formează două faze : o fază metanol-apă (în care se repartizează contaminanții hidrofili) și o fază cloroform care conține lipidele.

Experiența 133. EXTRACȚIA LIPIDELOR DIN ȚESUTURILE ANIMALE

Lipidele din ficatul de șobolan sînt extrase cu un amestec de metanol-cloroform-apă ; contaminanții hidrofili sînt partiționați în faza apoasă, iar cei hidrofobi în cloroform.

Reactivi și aparatură

— metanol ;
— cloroform ;
— benzen ;
— omogenizator ;
— centrifugă ;
— pîlnie separatoare ;
— evaporotator.

Modul de lucru

Se suspendă 6—7 g ficat proapăt în 3 ml apă și 30 ml amestec metanol-cloroform (2 : 1, v/v) și se omogenizează timp de 2 minute la temperatura camerei, într-un aparat Waring blendor. Omogenatul este supus unei centrifugări iar rezidiul este reextras cu 38 ml amestec metanol-cloroform-apă (2 : 1 :0,8) și omogenizat 2 minute. După centri-

fugare, supernatantele combinate sînt diluate cu 20 ml cloroform și 20 ml apă și sînt supuse separării într-o pîlnie separatoare. Se colectează faza inferioară de cloroform și se concentrează într-un evaporotator, la o temperatură de 30—35°C. Pentru a îndepărta urmele de apă se adaugă benzen. Rezidiul este dizolvat în 10 ml cloroform.

Experiența 134. EXTRACȚIA LIPIDELOR DIN ȚESUTURILE VEGETALE

Lipidele din țesuturile verzi și din organele nefotosintetizatoare pot fi extrase cu un amestec metanol-cloroform-apă, repartizîndu-se în faza cloroformică.

Reactivi și aparate

— ca în experiența 133 ;
— izopropanol.

Modul de lucru

100 g material vegetal (frunze proaspete de spanac, rădăcini de morcov) este mărunțit cu ajutorul unui bisturiu, suspendat în 300 ml amestec metanol cloroform (2 : 1, v/v) și omogenizat timp de 2 minute la temperatura camerei, cu ajutorul unui omogenizator cu cuțite, tip Waring blendor. Omogenatul este filtrat și rezidiul este resuspendat în 300 ml amestec metanol-cloroform (2 : 1) și 80 ml apă, omogenizat și refiltrat. Rezidiul depus pe hîrtia de filtru este spălat cu 150 ml metanol-cloroform (2 : 1). Filtratele combinate sînt trecute într-o pîlnie separatoare, peste care se adaugă 250 ml cloroform și 290 ml apă. Fazele sînt lăsate să se separe și se colectează stratul cloroformic. Acesta este diluat cu benzen, concentrat la un evaporotator și rezidiul este imediat dizolvat în 25 ml cloroform.

În cazul materialelor vegetale care conțin hidrolaze stabile, extracția se realizează astfel : la 100 g frunze macerate se adaugă 300 ml izopropanol fierbinte și se omogenizează 1—2 minute. Omogenatul fierbinte este filtrat, iar rezidiul este spălat cu 200 ml izopropanol fierbinte. Rezidiul este reluat în 200 ml amestec cloroform-izopropanol (1 : 1, v/v), omogenizat și filtrat. Rezidiul obținut în urma filtării este spălat cu un amestec cloroform-izopropanol (1 :) și în final cu cloroform. Filtratele sînt combinate, concentrate cu ajutorul unui evaporotator și lipidele reziduale sînt reluate în 200 ml cloroform. Extractul lipidic brut este spălat de trei ori cu cîte 100 ml apă. Soluția cloroformică este apoi diluată cu benzen și concentrată la sec cu ajutorul unui evaporotator. Rezidiul este dizolvat imediat în 25 ml cloroform și soluția este clarificată prin centrifugare.

Experiența 135. EXTRACȚIA LIPIDELER DIN MICROORGANISME

Lipidele din microorganisme (bacterii, virusuri, alge, fungi) pot fi extrase din pasta celulară umedă utilizînd un amestec metanol-cloroform-apă.

Reactivi și aparate

— ca în experiența 133.

Modul de lucru

O cantitate de pastă celulară umedă, corespunzînd la 40—50 mg greutate uscată, este reluată cu 1 ml apă și se adaugă 3,75 ml amestec metanol-cloroform (2 : 1). Amestecul este lăsat la temperatura camerei, 2—2 ore, sub agitare ocazională, cînd pereții celulari sînt dezintegrați sub acțiunea agentului de extracție. Extractul este centrifugat, iar rezidiul este resuspendat în 4,75 ml dintr-un amestec metanol-cloroform-apă (2 : 1 : 0,8), supus unei agitări intermitente și centrifugat. (La supernatantele combinate se adaugă 2,5 ml cloroform și 2,5 ml apă. Amestecul este trecut într-o pîlnie de separare, agitat pentru a favoriza repartiția moleculelor între cele două faze, lăsat să se separe. Se colectează stratul cloroformic, se diluează cu benzen pentru a îndepărta urmele de apă și se aduce la sec cu ajutorul uuni evaporotator. Rezidiul lipidic este dizolvat imediat în amestec cloroform-metanol (1 : 1). Soluția este centrifugată și adusă la un volum cunoscut de cloroform.

Experiența 136. EXTRACȚIA LIPIDELOR DIN PLASMA SANGUINĂ SAU DIN CELULELE SÎNGELUI

Se colectează sînge în reactiv citrat-dextroză și se separă plasma de celulele sîngelui. Se extrag lipidele cu un amestec metanol-cloroform.

Reactivi

— reactiv citrat-dextroză (18,8% citrat trisodic, 6,7% acid citric și 1,8% glucoză).

— soluție de ser fiziologic NaCl 0,9%.

Modul de lucru

1 ml sînge total se tratează cu 0,15 ml reactiv citrat-dextroză și se centrifughează. Se separă plasma, iar celulele sanguine sînt resuspendate în 1 ml soluție ser fiziologic. Suspensia celulară se centrifughează, supernatantul se combină cu plasma, iar celulele sînt resuspendate în 1 ml ser fiziologic.

La 1 1ml suspensie celulară (sau 1 ml plasmă) se adaugă 3,75 ml amestec metanol-cloroform (2 : 1) — extracția realizîndu-se ca în experiența anterioară.

8.3. PĂSTRAREA EXTRACTELOR LIPIDICE

Datorită tendinței lipidelor de-a suferi reacții de peroxidare și hidroliză, se recomandă ca studiile analitice să fie realizate pe extracte proaspăt preparate.

Dacă extractele trebuie păstrate cîteva săptămîni, se recomandă dizolvarea lipidelor într-un amestec de cloroform-metanol (2 : 1) preparat din solvenți organici proaspăt distilați și păstrarea la 0°C, în vase de sticlă cu dop rodat, închise și umplute complet cu solvent.

Pentru păstrarea extractelor lipidice perioade mai lungi de timp (1—2 ani) se recomandă adăugarea unor antioxidanți : tocoferol sau 2,6-di-t-butil-4-metil fenol — în concentrație de 0,05%, soluția fiind stocată la —40°C, sau chiar la temperaturi mai scăzute.

8.4. PROPRIETĂȚILE GENERALE ALE LIPIDELOR

Lipidele sînt compuși naturali insolubili în apă și solubili în solvenți nepolari ca acetona, alcoolii, cloroformul sau benzenul. Prin hidroliză alcalină, proces numit saponificare, ia naștere un alcool și săruri de sodiu sau de potasiu a acizilor grași constituienți, produși solubili în apă.

Experiența 137. TESTAREA PROPRIETĂȚILOR LIPIDELOR

a. Testarea solubilității lipidelor

Reactivi și materiale

— lipide : ulei de măsline (sau alt ulei vegetal), untură de porc (sau altă grăsime animală), lecitină ;
— cloroform ;
— etanol.

Modul de lucru

Se testează solubilitatea unui ulei vegetal, a unei grăsimi animale și a lecitinei în apă, etanol și cloroform. Se comentează rezultatele.

b. Testarea acroleinei pentru glicerol

Reactivi

— glicerol
— $KHSO_4$ anh.

Modul de lucru

Se adaugă 1,5 g $KHSO_4$ anh. într-o eprubetă termorezistentă și cîteva picături de glicerol. Se încălzește ptuernic și se urmărește mirosul gazului dezvoltat. În această reacție, glicerolul este dezhidratat cu $KHSO_4$ anh., cu formarea unei aldehide nesaturate, acroleina care are un miros caracteristic, neplăcut.

$$\begin{array}{l} CH_2\text{—}OH \\ | \\ CH\text{—}OH \\ | \\ CH_2\text{—}OH \end{array} + KHSO_4 \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2 \\ \| \\ CH \\ | \\ CHO \end{array} + 2H_2O$$

c. Testarea gradului de nesaturare

Reactivi și materiale

— ulei de măsline, grăsime de porc, lecitină
— cloroform
— brom în cloroform (1 ml Br_2 în 20 ml $CHCl_3$)

Modul de lucru

În trei eprubete separate se plasează cantități mici de ulei de măsline, grăsime de porc și lecitină, care se dizolvă în 1 ml cloroform. Se mai pregătește o a patra eprubetă — martor, în care se pipetează 1 ml cloroform. Cu ajutorul unei pipete Pasteur se adaugă, picătură cu pică-

tură, soluție de brom în cloroform pînă se formează o coloratie galbenă, stabilă. Se notează numărul de picături necesar în fiecare caz și se comentează rezultatele experimentale obținute.

d. Testarea prezenței peroxizilor

Reactivi și materiale

— ulei de măsline ;
— cloroform ;
— acid acetic glacial ;
— soluție KI 10%.

Modul de lucru

Se amestecă 1 ml ulei de măsline cu 1 ml cloroform și se adaugă 2 ml acid acetic glacial și o picătură de KI 10%. Amestecul se omogenizează prin agitare și se lasă 5 minute în repaus. Prezența peroxizilor este remarcată prin eliberarea de iod.

e. Prepararea și proprietățile săpunurilor

Săpunurile sînt săruri ale acizilor grași. Cele mai comune săpunuri sînt cele solubile, care sînt săruri de postasiu și de sodiu. Sărurile de magneziu, de calciu sînt săpunuri insolubile.

Săpunurile de Na și K stabilizează emulsiile de ulei în apă. Ele sînt preparate prin saponificare (hidroliză alcalină, a grăsimilor conform reacției :

$$\begin{array}{l} CH_2{-}O{-}CO{-}R \\ | \\ CH{-}O{-}CO{-}R' \\ | \\ CH_2{-}O{-}CO{-}R'' \end{array} + 3\,NaOH \rightarrow R(R',R'){-}COONa + \begin{array}{l} CH_2{-}OH \\ | \\ CH_2{-}OH \\ | \\ CH{-}OH \end{array}$$

Reactivi și materiale

— ulei de măsline
— benzen
— soluție NaOH 1 N, în etanol
— amestec metanol : apă (1 : 1)
— NaCl solid
— soluții 2 M de $CaCl_2$, $MgSO_4$ și $CuSO_4$
— lecitină
— albastru de metilen

Modul de lucru

Se amestecă 2 ml ulei de măsline cu 5 ml benzen și se adaugă 25 ml soluție NaOH 1 N etanol. Amestecul se refluxează 30 minute, după care aparatul se rearanjează pentru distilare și se evaporă la sec. Reziduul este dizolvat în 50 ml metanol : apă (1 : 1). La soluția obținută se adaugă NaCl solid pînă la saturare. Se formează un precipitat de săpun sodic, care stă la suprafață. Săpunul de sodiu se separă prin filtrare.

Se dizolvă o parte din săpunul separat în 5 ml apă și se plasează în trei eprubete diferite, la care se adaugă volume egale din soluțiile de $CaCl_2$ 2M, $MgSO_4$ 2M și $CuSO_4$ 2M. Se formează săpunurile insolubile de calciu, magneziu și cupru.

Se dizolvă altă porțiune de săpun sodic în 10 ml și se plasează într-o pîlnie de separare împreună cu 10 ml ulei de măsline. Prin agitare energică se formează o emulsie, care este turnată într-o placă Petri ce conține o mică cantitate de albastru de metilen : ulei de măsline (1 : 1) ce dă un amestec solubil galben.

Se repetă experimentul utilizînd 10 ml soluție lecitină, în loc de soluția de săpun. Se comentează tipul de emulsii formate.

8.5. METODE DE DOZARE ȘI ANALIZA A LIPIDELOR

În această secțiune vom prezenta cîteva procedee analitice de caracterizare a extractelor lipidice. Extractul obținut prin unul din procedeele descrise anterior este diluat la un volum constant cu cloroform, astfel ca în final să dea o soluție de o concentrație 1%. Această soluție reprezintă o soluție stoc.

Metodele prezentate pot fi aplicate atît extractelor brute cît și componentelor lipidice, obținute după fracționare.

Experiența 138. DETERMINAREA GREUTĂȚII USCATE

Reactivi și aparatură

— extract lipidic
— KOH
— exicator
— bombă cu azot ;
— pompă de vid, cu o presiune mai mică de 0,1 mm Hg
— balanță analitică.

Modul de lucru

Se pipetează o cantitate cunoscută într-un flacon cu dop rodat, care a fost cîntărit în prealabil cu o precizie de trei zecimale. Se evaporă solventul într-un curent de azot, la o temperatură de 30°C, apoi rezidiul lipidic se usucă prin plasarea flaconului într-un exicator, pe granule de KOH, adaptat la pompa de vid. Se introduce apoi azot în exicator, se închide flaconul și se cîntărește din nou. Uscarea probei în exicator, în vacuum, se repetă pînă cînd greutatea rămîne constantă, cu o diferență între două cîntăriri de maximum ± 0,05 mg.

În calcularea rezultatelor se ține seama atît de volumul extractului lipidic care a fost prelucrat, cît și de raportul grame țesut — ml solvent de delipidizare,utilizat în procedeul de extracție a lipidelor. Rezultatele experimentale se exprimă în g lipide la 100 g țesut.

Experiența 139. DOZAREA FOSFORULUI TOTAL DIN FOSFOLIPIDE

Soluții

— soluție de acid percloric 72% ;
— soluție molibdat de amoniu 8,4%, preparată în apă distilată.

— reactiv Amidol : se dizolvă 0,5 g 2,4-diaminofenol diclorhidrat și 10 g metabisulfit de sodiu în 50 ml apă distlată, după care soluția se filtrează ;

— soluție standard de fosfor, care conține 100 μg P într-un ml.

Modul de lucru

Se evaporă la sec, într-un curent de aer, la 35°C, un volum cunoscut din extractul lipidic. După ce se adaugă 2 ml $HClO_4$ se încălzește amestecul pe un bec de gaz, pentru digestie, pînă cînd soluția devine clară și incoloră. Se diluează proba pînă la un volum final de 12,5ml și se amestecă energic. Se adaugă 2 ml reactiv Amidol și 1 ml soluție molibdat, se amestecă și după 20 minute se diluează cu apă pînă la un volum final de 25 ml și se citește extincția la 680 mm față de apă distilată.

Extincțiile sînt transformate în termeni de concentrație (μg P) cu ajutorul unei curbe etalon. Datele experimentale sînt prelucrate ținînd seama de volumul de extract lipidic luat în lucru și de raportul g țesut — ml solvent de xtracție.

Construirea curbei etalon

Din soluția standard de fosfor, se fac diluții în așa fel încît cantitatea de fosfor anorganic variază între 10 și 100 μg. Aceste probe se prelucrează similar cu extractul lipidic.

Observație

Cele mai bune rezultate se obțin cînd volumul de extract lipidic care se ia inițial în lucru conține între 10 și 100 μg P și mai puțin de 2 mg lipide.

Experiența 140. DOZAREA AZOTULUI AMINIC DIN LIPIDE

Soluții și reactivi

— metil celosolv redistilat peste $SnCl_2$ și diluat cu apă în proporție 9 : 1 (90%).

— reactiv ninhidrină : se dizolvă 2 g ninhidrină și 3 g hidrindantină în 75 ml metil celosolv, se adaugă 25 ml soluție tampon acetat sodic 4 N, pH 5,5 și se transferă într-o sticlă brună, fiind păstrat sub azot.

— soluție tampon acetat sodic, 4 N, pH 5,5 : se dizolvă 54,4 g CH_3—COONa·3 H_2O în 40 ml apă, se adaugă 10 ml acid acetic glacial și se diluează la 100 ml.

— soluție standard de glicină, 400 nmoli/ml metil celosolv.

Modul de lucru

Într-o eprubetă cu dop rodat se pipetează soluția de probă (lipide totale sau componente pure), care se evaporă la sec într-un curent de azot. Se dizolvă rezidiul în 1 ml metil celosolv, se adaugă 1 ml reactiv ninhidrină și se încălzește pe baie de apă în fierbere timp de 20 minute. După răcirea probelor, se adaugă 5 ml metil celosolv, se amestecă și se citește extincția la 575 nm față de apă.

Extincțiile sînt transformate în termeni de concentrație (nmoli) cu ajutorul unei curbe etalon. Datele experimentale sînt prelucrate ținînd seama de volumul soluției de lipide luat în lucru și de cantitatea de lipide totale din acesta.

Construirea curbei etalon

Din soluția standard de glicină, se fac diluții, în așa fel încît să obținem probe de 50, 100, 200, 300 și 400 nmoli/ml. Diluțiile se realizează cu metil celosolv. Probele sînt prelucrate similar cu soluția de lipide.

Experiența 141. DOZAREA ZAHARURILOR TOTALE DIN GLICOLIPIDE

— soluție 5% de fenol, preparată în apă distilată

— H_2SO_4 concentrat

— soluție standard de glucoză 0,222 mM (se prepară prin dizolvarea a 100 mg glucoză în 250 ml apă).

Modul de lucru

Se pipetează un volum cunoscut de extract lipidic, care se evaporă la sec într-un curent de azot. La reziduu se adaugă 2 ml apă și se agită energic. Se adaugă 1 ml soluție fenol 5%, se agită, apoi se pipetează 5 ml soluție de acid sulfuric concentrat. Amestecul este lăsat la rece, timp de 30 minute, după care se citește exincția la 400 nm față de apă distilată.

Extincțiile sînt transformate în termeni de concentrație (nmoli zaharuri) cu ajutorul unei curbe etalon. Datele experimentale sînt prelucrate ținînd seama de volumul soluției de lipide luat în lucru și de cantitatea de lipide din acesta

Construirea curbei etalon

Din soluția standard de glucoză se fac diluții, în așa fel încît să obținem probe de 55,5 — 111 — 166,5 — 222 — 333 — 444 nmoli/ml. În fiecare probă se adaugă cîte 1 ml apă distilată, după care probele sînt prelucrate similar cu soluția de lipide.

Experiența 142. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE DIN SERUL SANGUIN

Reactivi și soluții

— acid sulfuric 95—97% (densitate 1,84)

— soluție standard de lipide (1000 mg trioleină/100 ml cloroform)

— reactiv fosfo-vanilinic : se prepară o soluție 8×10^{-3}M de vanilină în acid fosforic 11,9 M.

Modul de lucru

În două eprubete cu 0,05 ml ser sanguin și 0,05 ml soluție standard se pipetează cîte 2 ml acid sulfuric concentrat. Eprubetele se agită energic, se incubează 10 minute pe baie de apă la fierbere, după care se lasă să se răcească 5 minute în apă rece. Prin acest tratament s-a realizat deproteinizarea probelor. Din cele două eprubete se scot cîte 0,1 ml și se tratează cu cîte 2 ml reactiv fosfo-vanilinic. După 40—50 minute, proba cu serul în care dorim să dozăm lipidele totale și proba cu soluția

standard, prelucrată identic, sînt colorimetrate la 530 nm față de un martor constituit prin amestecarea a 0,1 ml acid sulfuric concentrat cu 2 ml reactiv fosfovanilinic.

Calculul rezultatelor

Conținutul în lipide totale a serului sanguin se calculează conform formulei :

$$\frac{E_{probă} \times 1000}{E_{standard}} \text{ mg/100 ml sau } \frac{E_{probă} \times 10}{E_{standard}} \text{ g/l}$$

Domeniul normal de concentrații în lipide totale, corespunzător unui organism sănătos, este de 450—1000 mg/100 ml.

Experiența 143. DETERMINAREA ECHIVALENTULUI DE NEUTRALIZARE

Extractul cloroformic al lipidelor totale are un pH acid datorită acizilor grași liberi, fosfatidelor acide, precum și altor lipide acide. Această aciditate poate fi titrată pentru a determina greutatea echivalentă sau echivalentul de neutralizare.

Reactivi și soluții

— soluție metanolică de NaOH 0,025 N : se dizolvă 2 g NaOH în 35 ml metanol distilat, se centrifughează și se diluează supernatantul pînă la un volum final de 50 ml cu metanol ; la 5 ml din această soluție se adaugă 20 ml apă distilată și se diluează cu metanol pînă la un volum final de 20 ml

— soluție standard de HCl 0,01 N

— soluție indicator : 0,5 g o-crezol-red se dizolvă în 50 ml metanol 90%

— solvent : metanol-apă (9 : 1).

Modul de lucru

Se evaporă la sec, în curent de azot, un volum cunoscut de extract cloroformic al lipidelor totale. Se dizolvă rezidiul în 5 ml solvent, se adaugă 2 picături din soluția indicator și se plasează într-o baie pînă la fierbere.

Soluția de lipide fierbinte se titrează cu NaOH 0,025 N pînă la virajul culorii de la galben la roșu. Similar, se titrează 5 ml solvent metanol-apă, titrul reprezentînd o probă martor.

Pentru a determina normalitatea reală a soluției metanolice de NaOH, se titrează similar și 5 ml HCl 0,01 N.

Calculul rezultatelor

$$\mu\text{echivalenți de aciditate} = (V_{probă} - V_{control}) \times f \times 1000$$

unde $V_{probă}$ și $V_{control}$ reprezintă volumele soluției de NaOH cu care s-a titrat aciditatea din extractul lipidic și respectiv din solventul metanol-apă.

f reprezintă titrul soluției de NaOH, determinat cu soluția standard de HCl 0,01 N.

$$\text{Echivalentul de neutralizare} = \frac{\mu g \text{ probă}}{\mu echivalenți \text{ de aciditate}}$$

Experiența 144. DETERMINAREA INDICELUI DE IOD. METODA HÜBL

Indicele de iod este o valoare care indică gradul de nesaturare a acizilor grași, prezenți în lipidele animale și vegetale. Clorura mercurică, în prezența iodului, formează monoclorura de iod :

$$HgCl_2 + 2\ I_2 \rightarrow HgI_2 + 2\ ICl$$

care reacționează cu un acid gras nesaturat după reacția generală :

$$—CH=CH— + 2ICl \rightarrow —CHI—CHI— + Cl_2$$

Excesul de ICl este determinat prin reacțiile :

$$ICl + KI \rightarrow KCl + I_2$$
$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaI$$

Indicele de iod reprezintă cantitatea de iod, exprimată în grame care se adiționează la 100 g substanță grasă.

Reactivi și soluții

— cloroform
— soluție de iod 5%, preparată în etanol 95%, în prezența de KI
— soluție de $HgCl_2$ 6%, preparată în etanol 95%
— soluție de KI 20%, preparată în etanol 95%
— soluție de tiosulfat de sodiu, 0,1 N
— soluție indicator, amidon 1%, preparată în apă distilată

Modul de lucru

În două vase Erlenmeyer cu dop rodat, perfect curate și uscate, se cîntăresc 0,5 g grăsime animală sau ulei vegetal. În fiecare vas se adaugă : 15 ml cloroform, 20 ml soluție iod 5% și 20 ml soluție $HgCl_2$ 6%. Amestecurile se agită energic. Dacă probele sînt opalescente, se adaugă cloroform în plus, în final pînă la obținerea unor soluții perfect clare. Se realizează și un *martor*, cu toți reactivii, cu excepția grăsimii.

Vasele se închid ermetic, se agită energic și se lasă în repaus, la întuneric, două ore, după care în fiecare se adaugă 25 ml soluție KI 20%. Excesul de iod se titrează cu tiosulfat pînă la apariția unei colorații galben-portocaliu. Se adaugă apoi 2—3 picături soluție de amidon 1% și se titrează în continuare cu tiosulfat, pînă la dispariția completă a culorii albastre.

Stabilirea titrului soluției de tiosulfat 0,1 N

Se dizolvă 0,3866 g bicromat de potasiu în 100 ml apă distilată. Într-un vas Erlenmeyer se pipetează : 20 ml soluție de bicromat de potasiu, 10 ml soluție KI 10%, 5 ml HCl concentrat și se adaugă 100 ml apă

distilată. Iodul rezultat este titrat cu soluția de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N. La 1 ml soluție tiosulfat corespund 0,0127 g iod, conform reacției :

$$K_2Cr_2O_7 + 6\ KI + 14\ HCl \rightarrow 8\ KCl + Cr_2Cl_6 + 7\ H_2O + 3\ I_2$$

Calculul rezultatelor

Indicele de iod se calculează după formula :

$$\frac{V_{control} - V_{probă}}{P} \times 0{,}0127 \times 100 = \text{g iod/100 g grăsime}$$

unde $V_{control}$ și $V_{probă}$ reprezintă volumele soluției de tiosulfat, utilizate pentru titrarea controlului și respectiv a probei ;

P — grame substanță grasă luată în probă.

Dacă titrul soluției de $Na_2S_2O_3$ este diferit de 1, rezultatele se înmulțesc și cu factorul soluției de tiosulfat.

Observații

Reacția de adiție a halogenilor nu este totdeauna cantitativă, fiind dependentă de caracterul și configurația spațială a dublelor legături. Astfel, izomerul acidului linolenic, acidul eleostearic deși are trei duble legături adiționează iodul saturîndu-se doar la nivelul a două duble legături.

Acest indice este utilizat în industria ușoară și alimentară pentru calcularea cantității de hidrogen necesare saturării acizilor grași nesaturați din structura uleiurilor vegetale, care pentru păstrare și transport reclamă solidificarea.

Experiența 145. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE

Indicele de saponificare reprezintă cantitatea de KOH exprimată în miligrame, necesară pentru saponificarea triacilglicerolilor și pentru neutralizarea acizilor grași eliberați, dintr-un gram de grăsime sau de ulei vegetal :

$$\begin{array}{lcl} CH_2\text{-}O\text{-}CO\text{-}R'' & & CH_2\text{-}OH\ \ R\text{-}COOH \\ | & & | \\ CH\text{-}O\text{-}CO\text{-}R' + 3\ KOH & \rightarrow & CH\text{-}OH\ \ + R'\text{-}COOH \\ | & & | \\ CH_2\text{-}O\text{-}CO\text{-}R & & CH_2\text{-}OH\ \ R''\text{-}COOH \end{array}$$

Reactivi și soluții

— soluție KOH 0,5 N, preparată în etanol

— soluție HCl 0,5 N

— soluție fenolftaleină 1%

Modul de lucru

Într-un vas Erlenmeyer cu dop rodat se cîntăresc 1,5—2,5 g material de analizat. Se adaugă 25 ml soluție de KOH 0,5 N și se refluxează 40—50 minute pe o baie de apă, la fierbere. După saponificare, conținutul trebuie să se prezinte sub forma unui lichid clar și omogen, fără

urme de grăsime sau ulei. Excesul de hidroxid de potasiu neutilizat pentru saponificarea grăsimilor este titrat cu o soluție de HCl 0,5 N, în prezența fenolftaleinei ca indicator.

Deoarece titrul soluției alcoolice de KOH se modifică, în special datorită carbonatării se recomandă efectuarea unei probe *control*, în care 25 ml soluție KOH 0,5 N sînt refluxați exact aceeași perioadă de timp ca proba, după care sînt titrați cu HCl 0,5 N.

Calculul rezultatelor

Indicele de saponificare x se calculează cu ajutorul formulei :

$$x = \frac{(V_{control} - V_{probă}) \cdot 28{,}055}{P}$$

unde $V_{control}$ și $V_{probă}$ reprezintă volumele soluției de HCl 0,5 N utilizate pentru neutralizarea controlului și respectiv probei ;

P — grame material supus saponificării ;

28,055 — mg KOH necesar neutralizării 1 ml HCl 0,5 N.

Observații

Saponificarea se poate realiza și cu soluție alcoolică de NaOH, în final pentru calcularea lui x, se multiplică cu 20, nu cu 28,055.

Indicele de saponificare ne dă unele informații asupra masei moleculare a acizilor grași din structura tricilglicerolilor, fiind invers proporțional cu masa moleculară.

Acest indice este funcție de prezența substanțelor nesaponificabile, a mono- și diacilglicerolilor, care îi scad valoarea, precum și a acizilor grași liberi, care îi cresc valoarea.

Experiența 146. DETERMINAREA UNOR COMPONENTE NESAPONIFIABILE

Materia nesaponifiabilă este importantă prin ponderea ei cantitativă în diferite grăsimi și uleiuri vegetale, precum și prin compoziția ei în diferite componente de o mare importanță biochimică : vitamine liposolubile, carotenoizi, colesterol etc.

După saponificarea materialului biologic, componentele nesaponifiabile sînt extrase în eter de petrol. Purificarea acestora se realizează prin adsorbție pe alumină, cînd acizii grași liberi sînt puternic adsorbiți, iar componentele nesaponifiabile sînt slab adsorbite.

Reactivi și soluții

— soluție KOH 5%, preparată în metanol

— soluție HCl diluată 1 : 1 (v/v)

— eter de petrol p.f. 30—60°C

— eter etilic fără peroxizi (se amestecă, sub agitare, eterul etilic cu o soluție de $FeSO_4$ pînă cînd culoarea verde a acesteia nu se mai modifică, apoi se spală eterul cu apă și se usucă pe sulfat de sodiu anhidru)

— alumină

Modul de lucru

Se omogenizează 2 g material biologic, se adaugă 25 ml soluție KOH 5% în metanol și se saponifică prin refluxare timp de 60 minute. Se răcește conținutul balonului de refluxare și se aduce pH acestuia la valoarea 2 prin adăugare de HCl, soluție diluată. Componentele nesaponificabile se extrag într-o pîlnie de separare cu un volum de eter de petrol. Extracția se repetă de două ori. Se reunesc toate extractele și se spală cu apă distilată, pînă la neutralizarea apelor de spălare. Extractul în eter de petrol se evaporă la sec, în vid. Rezidiul se reia cu 5 ml cloroform. În soluția cloroformică se adaugă 1 g albumină, iar amestecul se omogenizează timp de 10 minute. După centrifugare, se păstrează supernatantul care conține componentele nesaponificabile, care după identificare pot fi dozate prin una din metodele pe care le vom descrie în continuare.

Experiența 147. DOZAREA COLESTEROLULUI PRIN METODA LIEBERMANN-BURCHARD

Anhidrida acetică reacționează cu colesterolul, în mediu puternic acid de H_2SO_4, formînd produși de reacție, colorați în albastru-verde. Natura exactă a produsului colorat nu este cunoscută, avînd loc probabil esterificarea grupării hidroxil din poziția 3 și o serie de rearanjări în moleculă.

Serul sanguin este tratat cu un amestec etanol-acetonă, care extrage colesterolul și alte lipide și precipită proteinele. Solventul organic este îndepărtat prin evaporare pe o baie de apă și rezidiul obținut este reluat în cloroform. Colesterolul este dozat în soluția cloroformică prin reacția Liebermann.

Reactivi și soluții

— amestec etanol : acetonă (1 : 1)
— cloroform
— reactiv Liebermann : se amestecă 30 părți anhidridă acetică cu o parte acid sulfuric (densitate 1,84) imediat înaintea folosirii
— soluție standard de colesterol 0,5 g% preparată în cloroform.

Modul de lucru

Se pipetează 0,2 ml ser sanguin într-o eprubetă și se adaugă 10 ml amestec etanol : acetonă (1 : 1). După agitare energică, proba se incubează pe o baie de apă la fierbere pînă solventul începe să fiarbă. După 5 minute, proba se răcește la temperatura camerii și se centrifughează. Se colectează supernatantul care se evaporă la sec pe baie de apă, iar rezidiul se reia în 2 ml cloroform.

Se adaugă 2 ml reactiv Liebermann, se agită energic, iar după 10 minute staționare la temperatura camerii și la întuneric se citește extincția față de apă, la 680 nm. Extincția se transformă în termeni de concentrație fie cu ajutorul unei curbe etalon, fie prin realizarea reacției Liebermann cu o soluție de colesterol cu o concentrație cunoscută de 0,5 mg/2 ml. Această concentrație se obține prin diluarea de 20 ori (1 ml + 19 ml apă) a soluției standard 0,5%.

Calculul rezultatelor

Concentrația de colesterol din sînge poate fi calculată utilizînd formula :

$$\frac{E_{\text{proba}}}{E_{\text{standard}}} \times 0{,}5 \times 500 \text{ mg/100 ml}$$

unde E_{proba} și E_{martor} sînt extincțiile citite pentru dozarea colesterolului din serul sanguin deproteinizat și respectiv pentru soluția de 0,5 mg/2 ml — standard.

Dozări mult mai exacte se realizează utilizînd curba etalon. Pentru construirea ei se efectuează diluții ale soluției standard 0,5 g % cu cloroform, realizîndu-se următoarele concentrații într-un volum final de 2 ml : 0,5 mg — 1 mg — 2,5 mg — 5 mg — 10 mg. În fiecare probă se adăuga cîte 2 ml reactiv Liebermann și după 10 minute se citesc extincțiile la 680 nm. Pe abscisă se indică mg/2 ml colesterol, iar pe ordonată — extincțiile. Concentrația de colesterol din proba de ser este determinată prin extrapolare. Valoarea obținută trebuie multiplicată cu 500 deoarece în determinare s-au luat 0,2 ml ser și rezultatele trebuie exprimate în mg colesterol din 100 ml ser.

Experiența 148. DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL ȘI LIBER PRIN METODA ZLATKIS

Colesterolul liber este distribuit în mod egal în celule și plasmă în timp ce forma esterificată se găsește numai în plasmă. Metoda se bazează pe proprietatea digitoninei de a precipita colesterolul liber.

Reactivi și soluții

— soluție stoc de clorură ferică : se dizolvă 2,5 g $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ în H_3PO_4 85% și se aduce la un volum final de 100 ml ; soluția se păstrează într-o sticlă brună închisă etanș, la temperatura camerii, se aruncă după aproximativ trei luni cînd apare un precipitat ;

— reactiv de colorare : se diluează 4 ml soluție stoc de $FeCl_3$ cu acid sulfuric concentrat pînă la un volum final de 50 ml, soluția se aruncă cînd devine tulbure ;

— soluție de digitonină 1% : se dizolvă 1 g digitonină în 50 ml etanol 95% și se diluează la 100 ml cu apă distilată ; păstrată la întuneric soluția ese stabilă șase luni ;

— soluție standard de colesterol 0,01% : se prepară prin dizolvarea a 100 mg colesterol în 100 ml acid acetic glacial și se diluează 1 : 10 cu acid acetic glacial ;

— amestec etanol : acetonă (1 : 1).

Determinarea colesterolului total

Se pipetează 0,1 ml ser sanguin într-o eprubetă și se adaugă 10 ml amestec pe baia de apă la fierbere pînă solventul începe să fiarbă. După bează pe baia de apă la fierbere pînă solventul începe să fiarbă. După 5 minute, proba se răcește la temperatura camerii și se centrifughează. Se colectează supernatantul care se evaporă la sec pe baia de apă, iar

rezidiul se reia în 6 ml acid acetic glacial. După adăugarea a 4 ml reactiv de colorare, probele se agită energic, iar după 10 minute se citește extincția la 550 nm față de un martor preparat din 5 ml reactiv de colorare + 6 ml acid acetic glacial.

Extincțiile se transformă în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon. Se realizează diluții din soluția standard de colesterol 0,01%, astfel ca să se prepare probe cu 0,1 mg — 0,2 mg — 0,3 mg — 0,4 mg și 0,5 mg în 6 ml acid acetic glacial. La aceste probe se adaugă cîte 4 ml reactiv de colorare iar extincțiile citite la 550 nm sînt schițate fără de concentrațiile de colesterol din probe.

În această determinare interferă pigmenții heminici.

Determinarea colesterolului liber

Se pipetează 0,1 ml ser sanguin într-o eprubetă și se adaugă 10 ml amestec etanol : acetonă 1 : 1. După agitare energică proba se incubează pe o baie de apă la fierbere. După 5 minute proba se răcește la temperatura camerii și se centrifughează. Se colectează supernatantul care se evaporă la sec pe baia de apă. Se reia rezidiul în 1 ml amestec etanol : acetonă și se adaugă 1 ml soluție 1% de digitonină. După agitarea energică a amestecului, acesta se lasă să stea 10 minute la temperatura camerii, după care se centrifughează la 3 000 r.p.m., timp de 5 minute. Supernatantul se aruncă, iar precipitatul se spală cu 4 ml acetonă. După centrifugare, se aruncă supernatantul și se îndepărtează urmele de solvent din precipitat. Se transferă cantitativ precipitatul într-o eprubetă prin spălare cu acid acetic glacial, pînă se obține o soluție cu un volum final de 6 ml. Dozarea colesterolului liber se face prin același procedeu ca cel prezentat în cazul colesterolului total.

Calculul rezultatelor

Valorile concentrațiilor de colesterol total și liber ,obținute prin extrapolarea extincțiilor pe curba etalon trebuie multiplicate cu 1 000 pentru a obține mg/100 ml ser.

Cantitatea de colesterol esterificat se calculează din diferența mg% colesterol total — mg% colesterol liber.

Observații

Valorile normale de colesterol total în sînge variază de la 100—250 mg/ml. Valoarea medie este de 200 mg/100 ml, crește lent cu vîrsta, atinge un maxim la40—50 ani, după care scade.

Colesterolul esterificat reprezintă 50—80% din valoarea colesterolului total.

Valori crescute de colesterol total sînt înregistrate în maladii coronariene (peste 300 mg/100 ml), în nefrite, diabet, mixedeme și xantomatoze.

Experiența 149. DOZAREA TRIACILGLICEROLILOR

Triacilglicerolii pot fi extrași selectiv cu un amestec etanol : eter de petrol (1 : 1). Glicerolul, eliberat după saponificare, este oxidat cu acid periodic, cu formarea de formaldehidă și acid formic, care reacționează cu acidul cromotropic dînd un compus cromoforic, roz.

Reactivi și soluții.

— amestec etanol : eter de petrol (1 : 1)

— amestec etanol : eter de petrol (4 : 1)

— soluție de KOH 0,4%, preparată în etanol 96% proaspăt

— soluție metaperiodat de sodiu : se dizolvă 1,06 g metaperiodat de sodiu în 2 ml acid sulfuric concentrat și se aduce la un volum final de 100 ml cu apă distilată

— soluție de arsenit de sodiu 5% : se dizolvă 225 g NaOH și 5 g As_2O_3 în apă distilată și se aduce la un volum final de 100 ml

— soluție de acid cromotropic : se prepară o soluție A 1% de acid cromotropic în apă distilată și o soluție B prin amestecarea a 500 ml apă distilată cu 300 ml H_2SO_4 concentrat. Se amestecă soluțiile A și B, se răcește amestecul rezultat și se aduce la un volum final de 1 000 ml cu apă distilată.

— soluție stoc de trioleină 2 g/100 ml cloroform ; în momentul întrebuințării se diluează 0,2 ml soluție stoc la 10 ml cu alcool izopropilic.

Modul de lucru

Într-o eprubetă se pipetează 0,1 ml ser și 2 ml amestec etanol : eter de petrol (1 : 1). Amestecul se incubează pe o baie de apă la fierbere pînă solvenții încep să fiarbă, se răcește la temperatura camerii și se tratează cu 6 ml eter de petrol și 1 ml apă distilată. Eprubeta se agită, iar după staționare se separă două faze, cea superioară conține triacilglicerolii. Se păstrează faza superioară, iar faza inferioară se supune unei noi extracții cu 6 ml eter de petrol și 1 ml apă distilată. Se colectează faza superioară care se adaugă celei obținute prin prima extracție.

4 ml extract de triacilgliceroli în eter de petrol sînt tratați cu un amestec de etanol : eter de petrol 4 : 1. După agitare, se lasă să se separe două faze și se colectează faza superioară. Aceasta din urmă este retratată cu 1 ml etanol : eter de petrol (4:1), se colectează faza superioară care se adaugă primului extract.

Extractele sînt evaporate la sec, iar rezidiul este reluat în 0,5 ml soluție alcoolică de KOH. Amestecul este incubat 15 minute pe o baie de apă la 60°C, răcit la temperatura camerii. Se adaugă 0,5 ml H_2SO_4 și 0,5 ml apă distilată și din nou este incubat, sub agitare timp de 15 minute pe o baie de apă la fierbere. După răcire se adaugă 4 ml eter de petrol, se agită și se lasă în repaus timp de 5 minute. Se îndepărtează eterul prin aspirație și se adaugă 0,1 ml soluție periodat. Dacă culoarea galbenă formată dispare, se adaugă o nouă cantitate de periodat. După 10 minute, se adaugă 0,1 ml arsenit de sodiu și 5 ml soluție de acid cromotropic. După o incubare pe baie de apă în fierbere, sub agitare, timp de 30 minute, proba se răcește și se colorimetrează la 570 mm față de un martor care se realizează în același mod cu excepția faptului că în loc de 4 ml extract inițial de triacilgliceroli se pipetează 4 ml apă distilată.

Concomitent cu proba în care dozăm triacilglicerolii din serul sanguin trebuie realizată și prelucrarea unui amestec de 2 ml soluție trioleină diluată, 1 ml amestec etanol : eter de petrol (4:1) și 2 ml apă distilată.

Calculul rezultatelor

Cantitatea de triacilgliceroli din serul sanguin se poate exprima în mg trioleină prin utilizarea formulei :

$$\frac{E_{\text{probă}}}{E_{\text{standard}}} \times 2$$

Experiența 150. DOZAREA FOSFATIDILCOLINEI (LECITINEI)

Prin tratarea serului sanguin cu o soluție de acid tricloracetic sînt precipitate fosfolipidele, iar fosfații anorganici rămîn în soluție. Precipitatul separat este mineralizat, iar fosforul lipidic este dozat sub forma unui complex molibdenic.

Reacivi și soluții.

— soluție de acid percloric 70%.

— soluție de acid molibdenic : 10 g molibdat de amoniu se dizolvă în apă distilată și se aduce la un volum final de 100 ml, apoi se adaugă 100 ml H_6SO_4 concentrat, sub răcire.

— soluție etanol : se dizolvă 4,4369 g $NH_4H_2PO_4$ în apă distilată și se aduce la un volum final de 1 000 ml ; se diluează de 100 ori soluția de fosfat de amoniu și se consideră că 5 ml corespund la 1,5 lecitină.

— reactiv stanos : se dizolvă 0,1 g staniu în 2 ml HCl concentrat și se aduce la un volum final de 10 ml cu apă distilată.

— soluție de acid tricloracetic 5%.

— soluție de NaOH N.

— soluție de fenolftaleină 1%.

— acid azotic concentrat.

Modul de lucru

Se tratează 0,2 ml ser sanguin cu 5 ml acid tricloracetic 5%. Precitipatul este colectat după centrifugare la 3 000 r.p.m. timp de 5 minute. Se adaugă la precipitat 0,5 ml $HClO_4$ și 3 picături de HNO_3, după care amestecul este încălzit timp de 15 minute pe o baie de ulei la 180°C. După răcire, amestecul este neutralizat cu o soluție de NaOH, în prezență de fenolftaleină, pînă la apariția unei colorații roz. Se transferă conținutul eprubetei într-un balcon cotat de 25 ml, se aduce la semn cu apă distilată și se tratează cu 1 ml soluție de acid molibdenic și 0,25 ml reactiv stanos. Se citește extincția la 570 nm față de apă distilată.

Concomitent se prepară o probă martor prin tratarea a 2,5 ml apă distilată cu 0,5 ml acid percloric și 3 picături de HNO_3 concentrat. După mineralizare, proba martor se prelucrează similar cu proba de ser și în final se citește extincția la 570 nm față de apă distilată.

De asemenea, 2,5 ml soluție etalon diluată se tratează cu 0,5 ml $HClO_4$ și 3 picături de HNO_3 concentrat. Și proba etalon se mineralizează, se neutralizează și se colorează similar. Se citește extincția la 570 nm față de apă distilată.

Calculul rezultatelor

Concentrația de lecitină din ser, exprimată în grame la 1 000 ml ser, se calculează utilizînd formula :

$$\frac{E_{\text{probă ser}} - E_{\text{martor}}}{E_{\text{etalon}}} \times 1{,}5$$

Experiența 151. DOZAREA ACIZILOR GRAȘI DUPĂ OXIDARE CU DICROMAT-H_2SO_4

Metoda este bazată pe acțiunea reducătoare a acizilor grași asupra amestecului dicromat — acid sulfuric, soldată cu formarea unui compus colorimetriabil la 600 nm. Acizii grași eliberați după saponificare sînt redizolvați după acidifiere, solventul îndepărtat și sînt oxidați. Dacă este prezent colesterolul, se realizează o corecție pentru acesta. Procedeul reprezintă o modificare a metodei Bragdon.

Reacivi și soluții.

— soluție de KOH în etanol : imediat înaintea utilizării se amestecă 5 ml soluție KOH 50% în apă cu 70 ml etanol 95% ;

— soluție H_2SO_4 5 N ;

— soluție de acid sulfuric în etanol : se amestecă în părți egale H_2SO_4 5 N și etanol 95% ;

— cristale de carborund ;

— soluție de dicromat de potasiu : se dizolvă 15 g $K_2Cr_2O_7$ în 1 000 ml H_2SO_4 concentrat, amestecul se incubează timp de 2 ore la 100°C (nu mai mult !) ;

— soluție standard de acid palmitic : se dizolvă 100 mg acid palmitic în 100 ml etanol. Se pipetează cîte 1 ml în două eprubete cu dop rodat și se evaporă la sec ; fiecare eprubetă conține 1 mg acid palmitic ;

— soluție standard de colesterol : se dizolvă 100 mg colesterol în 100 ml etanol. Se pipetează cîte 1 ml în două eprubete cu dop rodat și se evaporă la sec ; fiecare eprubetă conține 1 mg colesterol.

Modul de lucru.

Se pipetează 10 ml extract lipidic (trebuie să conțină între 1 și 6 mg acizi grași) obținut prin unul din procedeele prezentate anterior*. Se adaugă un cristal de carborund și amestecul se încălzește la 100°C. După 10 minute se adaugă 2 ml soluție de KOH în etanol. Se evaporă amestecul aproape total prin încălzire într-o etuvă (timp de 1—1,5 ore). Aproape tot alcoolul trebuie evaporat, dar rezidul nu trebuie adus la sec. Se răcește flaconul, se acidifică cu 1 ml soluție alcoolică de acid sulfuric. Se încălzește flaconul circa 20 secunde și apoi se rotește pentru ca toată cantitatea de săpun formată să fie acidifiată. Se adaugă 15 ml eter de petrol și flaconul se plasează pe o baie de apă, la 20°C. Se închide etanș flaconul, se agită energic 30 secunde și se reia incubarea la 20°C încă 30 minute. Se pipetează cîte 5 ml extract eteric în două eprubete,

* Dacă extractul este realizat cu eter de petrol sau acetonă, solventul trebuie îndepărtat prin evaporare și rezidiul reluat în 5 ml etanol 95%.

notate No. 1 și No. 2. În cele două eprubete (No. 3 și No. 4) cu cîte 1 mg acid palmitic și în cele două eprubete (No. 5 și No. 6) cu cîte 1 mg colesterol se pipetează cîte 5 ml eter de petrol. Se ia o eprubetă curată (No. 7) în care se pipetează 5 ml eter de petrol.

Se plasează cele 7 eprubete pe o baie de apă la fierbere pentru a îndepărta complet eterul de petrol. După răcire, în fiecare eprubetă se pipetează 7 ml amestec oxidant $K_2Cr_2O_7$—H_2SO_4 și se agită energic. Eprubetele închise cu dopuri sînt incubate timp de o oră la 100°C, după care se răcește și li se adaugă — prin prelingere pe pereții eprubetei — 7 ml apă distilată. Conținutul eprubetelor se omogenizează cu grije, sub răcire, pentru a evita supraîncălzirea amestecului. După răcire, se colorimetrează la 600 nm conținutul eprubetelor 1—6 față de cel al eprubetei 7.

Calculul rezultatelor.

concentrația acizilor grași din 10 ml extract lipidic se calculează utilizînd formula :

$$\text{mg acizi grași/10 ml extract} = \frac{D \cdot O_{\text{probe 1,2}} - D \cdot O_{\text{probe 5,6}}}{D \cdot O_{\text{probe 3,4}}}$$

Experiența 152. DOZAREA ACIZILOR GRAȘI LIBERI CA SĂRURI DE CUPRU

Ionii de cupru formează cu acizii grași săpunuri insolubile de cupru care pot fi extrase în coloroform. Cantitatea de Cu^{2+} din extractul cloroformic este proporțională cu concentrația în acizi grași liberi și este dozată cu dietilditiocarbamat de sodiu.

Reacivi și soluții.

— soluție etalon de acid palmitic 5×10^{-3}M, preparată în cloroform ;
— cloroform ;
— reactiv cupric : se amestecă 270 ml trietanolamină 2×10^{-3}M cu 30 ml acid acetic M și 300 ml $CuSO_4$ 10%.
— soluție de dietilditiocarbonat de sodiu 0,1% preparată în n-butanol, imediat înaintea folosirii.

Modul de lucru.

0,5 ml soluție de testat se tratează cu 2,5 ml reactiv cupric și se agită energic. Se adaugă 5 ml cloroform, se agită din nou energic și prin centrifugare se separă trei faze : faza superioară apoasă, faza medie care conține proteina denaturată și faza inferioară care conține sărurile de cupru ale acizilor grași liberi, dizolvate în cloroform. Se separă cu grije, fără contamnări (!) cu straturile superioare, extractul cloroformic.

3 ml extract cloroformic se tratează cu 0,5 ml soluție de dietilditiocarbamat și extincția este citită la 440 nm față de apă distilată. Extincțiile sînt transformate în termeni de concentrație cu ajutorul unei curbe etalon.

Construirea curbei etalon.

Se prepară cinci diluții ale soluției etalon, care conțin de la 0 la 25 μmoli acid palmitic/5 ml cloroform. Se scot cîte 0,2 ml din fiecare diluție

și se evaporă la sec pe baie de apă la fierbere. Rezidiurile sînt reluate în 0,5 ml apă distilată (conțin 500 — 1000 — 1500 — 2000 — 2500 nmoli).

Se adaugă 2,5 ml reactiv cupric și se agită energic pentru a favoriza formarea palmitatului de cupru. Se adaugă 5 ml cloroform, se agită energic și prin centrifugare se separă două straturi. 3 ml extract cloroformic este tratat cu 0,5 ml soluție de dietilditiocarbamat. Extincțiile sînt citie la 440 nm față de apă distilată.

Indicînd pe abscisă nmoli acid palmitic iar pe ordonată extincțiile corespunzătoare se construiește curba etalon.

Prin extrapolare se determină concentrația de acizi grași liberi din 3 ml extract cloroformic — X nmoli.

μmoli acizi grași liberi din 100 ml soluție de testat (bilă) se calculează utilizînd formula :

$$\frac{X \cdot 5 \cdot 200}{3 \cdot 1000} = \frac{3}{X}$$

valoarea determinată cu ajutorul curbei etalon (nmoli acizi grași) este multiplicată cu 5/3 pentru a calcula concentrația din 5 ml cloroform, este multiplicată cu 200 pentru a raporta la 100 ml bilă (s-a pornit de la 0,5 ml) și se împarte la 1000 pentru a transforma nmoli în μmoli.

Experiența 153. DOZAREA ACIZILOR GRAȘI ESTERIFICAȚI

Esterii acizilor grași sînt transformați în săruri ferice ale acizilor hidroxamici corespunzători. Metoda poate fi utilizată pentru dozarea acizilor grași din triacilgliceroli și din fosfolipide, nedetectînd esterii colesterolului cu acizi grași cu catenă lungă, nici acizii grași neesterificați. Vom prezenta metoda descrisă de Stern și Shapiro.

Reacivi și soluții.

— soluție alcalină de hidroxilamină : se amestecă volume egale dintr-o soluție 2 M de clorhidrat de hidroxilamină și o soluție 3,5 N de NaOH ;

— soluție de $FeCl_3$, 0,37 M în 0,1 N HCl : se dizolvă 8,9 g $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ în 0,1 N HCl și se aduce la un volum final de 100 ml cu 0,1 N HCl ;

— soluție de HCl : se amestecă o parte HCl concentrat cu 2 părți apă distilată ;

— amestec etanol 95% — eter etilic (3:1) ;

— eter etilic ;

— soluție standard de trimiristină : se dizolvă 200 mg trimiristină în 200 ml cloroform ; se pipetează în eprubete cu dop rodat cîte 3 ml soluție (3 mg trimiristină) și se evaporă la sec ; se adaugă 15 ml amestec etanol-eter (3:1), se închid eprubetele, se incubează 2 minute la 60°C, se agită energic și se răcesc la temperatura camerii ; 1 ml conține 0,2 mg trimiristină.

Modul de lucru

Se pregătesc 5 eprubete : în No. 1 și No. 2 se pipetează cîte 3 ml bilă (alt fluid corporal sau extract tisular în amestec etanol : eter *), în No. 3 și No. 4 — 3 ml soluție standard de trimiristină și în No. 5 — 3 ml amestec etanol-eter etilic.

În fiecare eprubetă se adaugă cîte 1 ml soluție alcalină de hidroxilamină, se agită energic și se lasă să stea 20 minute la temperatura camerii. Se adaugă cîte 0,6 ml soluție diluată de HCl și din nou se agită energic. În final se adaugă cîte 1 ml eter etilic fără peroxizi și se amestecă. Se citesc extincțiile, la 520 nm, a probelor 1—4 față de proba 5.

Calculul rezultatelor

mg acid grac esterificat din 3 ml probă =

$$D \cdot O_{1,2} \times \frac{MM_{\text{acid miristic}}}{D \cdot O_{3,4}} \times \frac{0{,}6 \text{ mg}}{MM_{\text{trimiristinei}}}$$

unde $D \cdot O_{1,2;3,4}$, sînt mediile densităților optice citite pentru probele 1, 2 și 3, 4, iar MM — masele moleculare ale acidului miristic și ale trimiristinei.

Experiența 154. DOZAREA COLINEI

Colina, etanolamina, glicerolul și inozitolul din fosfatide și pasmalogene, precum și zaharurile din glicolipide sînt constituente solubile în apă, ce pot fi dozate în faza apă-metanol a hidrolizatelor lipidice.

Soluții

— soluție iod — iodură : se dizolvă 16 g iod și 20 g KI în apă distilată și se aduce la un volum final de 100 ml ;

— soluție 0,1 N de $Na_2S_2O_3$, din care se prepară proaspăt prin diluție o soluție 0,005 N.

Modul de lucru.

10 ml hidrolizat lipidic este tratat la rece cu 4 ml soluție I_2—KI. După 30 minute, staționare într-un vas cu gheață, suspensia este centrifugată la 3 000 r.p.m. timp de 15 minute. Supernatantul este îndepărtat cu grije, iar precipitatul este spălat de 5—6 ori cu apă rece (cu cîte 1 ml) pînă apele de spălare devin incolore. Operațiile se realizează la rece și cu mare grije pentru a nu antrena și precipitatul, care trebuie lăsat totdeauna acoperit cu un strat subțire de apă. Se reia precipitatul în 3 ml cloroform, iar soluția roșie de cloroform se titrează cu $Na_2S_2O_3$ 0,005 N pînă coloratia dispare. 1 ml de $Na_2S_2O_3$ corespunde la 0,55 μmoli colină.

* Dacă extractele tisulare au fost realizate cu alt solvent organic, se recomandă evaporarea lui la sec și reluarea rezidiului din etanol-eter etilic (3 : 1). În special acetona trebuie evitată.

Experiența 155. DOZAREA GLICEROLULUI

Glicerolul, în mediu acid și în prezența dicromatului de potasiu se descompune cu formare de apă și CO_2. Excesul de dicromat este dozat iodometric :

$$3\ C_3H_8O_3 + 7\ K_2Cr_2O_7 + 28\ H_2SO_4 = 9\ CO_2 + 7\ K_2SO_4 + 7\ Cr_2(SO_4)_3 + 40\ H_2O$$

$$K_2Cr_2O_7 + 6\ KI + 14\ HCl = 3\ I_2 + 8\ KCl + 2\ CrCl_3 + 7\ H_2O$$

$$3\ I_2 + 6\ Na_2S_2O_3 = 6\ NaI + 3\ Na_2S_4O_6$$

Reactivi și soluții.

— soluție de $ZnSO_4$ 5% ;
— soluție de dicromat de potasiu : se dizolvă 75 g $K_2Cr_2O_7$ în 500 ml apă distilată, se adaugă 105 ml H_2SO_4 concentrat și se aduce la un volum final de 1 000 ml cu apă distilată ;
— soluție de H_2SO_4 30% ;
— KI, cristale ;
— soluție de HCl 20% ;
— soluție de tiosulfat de sodiu 0,1 N.

Modul de lucru.

Într-un pahar Berzelius se cîntărește 1 g probă (glicerină, unt sau altă grăsime). Se adaugă 5 ml soluție $ZnSO_4$ 5% se agită energic și se aduce la un volum final de 100 ml cu apă distilată. Dacă soluția este tulbure se filtrează.

5 ml filtrat se tratează cu 10 ml soluție dicromat și 10 ml soluție 30% de H_2SO_4. Conținutul flaconului se incubează o oră pe o baie de apă la fierbere, după care se răcește și se aduce la un volum final de 100 ml.

Pentru dozarea glicerinei se iau 20 ml soluție, se adaugă 1 g KI și 10 ml soluție HCl 20%. Amestecul se titrează cu o soluție de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N în prezența amidonului, pînă la apariția unei colorații albastre.

Paralel, se realizează o probă martor, folosindu-se aceeași reactivi însă fără glicerină.

Calculul rezultatelor.

La 1 ml soluție de tiosulfat 0,1 N corespunde o cantitate de 0,657 g glicerină. Cantitatea de glicerină exprimată în mg din proba de grăsime inițială se calculează utilizînd relația $(V_1 — V_2) \times 0{,}657 \times 20 \times 5 =$ mg glicerină în probă

unde V_1 este media titrărilor pentru proba martor,

V_2 este media titrărilor pentru probe paralele cu glicerină ;

20 este un factor de multiplicare, deoarece 1 g glicerină a fost adus la un volum final de 100 ml, dar numai 5 ml au fost tratați cu dicromat și acid sulfuric ;

5 este un factor de multiplicare, deoarece au fost titrați numai 20 ml din cei 100 ml amestec de reacție.

0,657 este coeficientul de corespondență.

Experiența 156. DOZAREA VITAMINEI A.

Proprietatea vitaminei A de a absoarbe în regiunea ultravioletă a spectrului, cu un maxim de absorbție la 325 nm poate fi utilizată pentru dozarea acestui compus liposolubil. Metoda este rapidă, sensibilă, dar prezintă o mică specificitate — un număr mare de substanțe absorbind în aceeași regiune a spectrului. Pentru a corecta absorbția unor compuși contaminanți se poate aplica o formulă în scopul limitării contribuției acestora la absorbția vitaminei A :

$$E = 7 \times E_{325} - 2{,}625 \times E_{310} - 4{,}375 \times E_{334}$$

Un alt mod de dozare a vitaminei A o poate constitui determinarea extincției la 325 nm înainte și după o iradiere cu lumină ultravioletă. Scăderea extincției ca urmare a iradierii este o măsură a conținutului în vitamină A din probă, deoarece această vitamină este distrusă de lumina UV.

Materiale și soluții

— ulei de pește ;
— soluție standard de vitamină A (1 μg/ml în izopropanol, ținută la întuneric, în sticlă închisă) ;
— izopropanol.

Modul de lucru

Vitamina A poate fi dozată fie în proba de untură de pește diluată corespunzător cu izopropanol, fie în partea nesaponifiabilă a probei supuse saponificării.

Se măsoară extincția unei probe proaspăt preparate prin diluție cu izopropanol, la 325 nm față de izopropanol — E_1. Se scoate cuva din spectrofotometru și se expune în lumină UV pînă extincția nu mai scade și se notează — E_2.

În aceeași manieră se tratează o soluție standard de vitamină A (S_1 și S_2). Concentrația în vitamină A a probei se calculează utilizînd formula :

$$\mu g/ml = \frac{E_1 - E_2}{S_1 - S_2} \times f$$

unde f — este factorul de diluție.

8.6. METODE DE SEPARARE A LIPIDELOR DIN AMESTECURI

O etapă importantă în investigarea lipidelor din diferite surse biologice o constituie fracționarea amestecului în diferite categorii de lipide și apoi obținerea componentelor individuale în stare pură.

Lipidele din celulele animale și microbiene constau în principal (60—90%) din fosfatide și glicolipide, în timp ce în organismele vegetale, în special în frunze, predomină lipidele neutre : carotenoizi, clorofile etc. În semințele plantelor se găsesc cantități mari de triacilgliceroli și

concentrații mici de fosfatide. Din această cauză un procedeu de fracționare eficace pentru un anumit tip de țesut poate fi total ineficace pentru altă sursă biologică. Totuși există metode clasice de fracționare a lipidelor din amestecuri, care vor fi descrise în continuare — care pot fi adaptate în funcție de gradul de utilare al laboratorului nostru.

Experiența 157. FRACȚIONAREA LIPIDELOR DIN AMESTECURI PRIN PRECIPITARE CU ACETONĂ

Prin această metodă se poate realiza separarea eficientă a fosfatidelor de lipidele neutre din amestecurile lipidice extrase din țesuturile animale, din diferite surse biologice și din frunzele plantelor, procedeul fiind puțin eficace în cazul lipidelor din semințe sau pentru amestecuri formate din cantități mari de lipide neutre și concentrații mici de fosfatide.

Metoda se bazează pe proprietatea triacilglicerolilor și a altor lipide neutre de a fi solubile în acetonă rece și pe insolubilitatea majorității fosfatidelor în aceleași condiții de extracție.

Reactivi și soluții

— acetonă ;

— soluție de $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 10% preparată în metanol ;

— cloroform.

Modul de lucru

Procedeul poate fi aplicat unor extracte totale obținute din creier, ficat sau din drojdie, alge. Se evaporă pînă la 0,2—0,3 ml un volum de extract lipidic care conține aproximativ 100 mg lipide. La acest concentrat se adaugă 5 ml acetonă și 0,1 ml soluție de $MgCl_2$, se amestecă energic și se incubează pe o baie de gheață timp de o oră. Fosfatidele precipitate se izolează în urma centrifugării la 3 000 r.p.m., timp de 5 minute, iar supernatantul care conține lipidele neutre se colectează. Se spală de două ori precipitatul prin resuspendare în 1 ml acetonă rece, incubare pe gheață și centrifugare.

Supernatantele acetonice sînt reunite, uscate la sec, cîntărite și în final dizolvate într-un volum mic, cunoscut, de cloroform. Se calculează concentrația de lipide neutre din cantitatea totală (circa 100 mg) de lipide supuse fracționării. În cazul lipidelor nesaturate, numai un alicot din supernatantul acetonic este evaporat la sec și cîntărit — rezultatul extrapolîndu-se la întregul volum.

Fosfatidele precipitate sînt eliberate de excesul de acetonă într-un curent de azot, apoi sînt uscate într-un exicator peste KOH solid, adaptat la o pompă de vid. Rezidiul uscat este cîntărit și apoi redizolvat într-un volum mic, cunoscut, de cloroform.

Cele două fracții pot fi supuse separării prin cromatografie în strat subțire. Fracția solubilă în acetonă conține în principal gliceroli, steroli liberi și esterificați, hidrocarburi și pigmenți carotenoizi. Fracția insolubilă în acetonă rece conține în principal cerebozide, sulfatide, poliglicozil diacilgliceroli. În această fracție insolubilă se poate determina fosforul lipidic conform Experienței 139.

Experiența 158. FRACȚIONAREA LIPIDELOR DIN AMESTECURI PRIN CROMATOGRAFIE DE ADSORBȚIE

În cadrul cromatografiei de adsorbție, compușii de separat se leagă la stratul cromatografic, prin interacții ionice și polare, deci lipidele din amestecuri pot fi separate în funcție de numărul și tipul grupărilor lor polare. Compușii cu polarități apropiate nu pot fi separați.

După ce au fost sorbiți în stratul cromatografic, compușii lipidici din amestec sînt eluați cu solvenți cu o polaritate crescîndă în ordinea creșterii polarității lor : hidrocarburi, esteri ai cerurilor, esteri ai sterolilor, triacilgliceroli, alcooli grași, acizi grași liberi, chinone, steroli, diacilgliceroli, monoacilgliceroli, cerebrozide, sulfolipide, glicerofosfatide acide, fosfatidil etanolamina, lecitina, sfingomielina.

Materiale, solvenți și reactivi

— acid silicic * (100—200 sau 200—325 mesh), este încălzit la 120°C, timp de două ore, înaintea utilizării ;

— cloroform, acetonă și metanol, proaspăt distilați ;

— coloană cromatografică de dimensiunile 40x1,8 cm, la partea de sus fiind adaptată o pîlnie separatoare.

Modul de lucru

Se aplică pe coloana cromatografică o suspensie formată din 15 g acid silicic și 50 ml cloroform. Se deschide robinetul de ieșire pentru a favoriza sedimentarea stratului cromatografic și dizlocuirea bulelor de aer incorporate în acesta. Se spală stratul cromatografic cu circa două volume de coloană, de cloroform. Se obține o coloană împachetată cu un strat cromatografic de circa 14 cm înălțime. Cînd toată cantitatea de cloroform a pătruns în stratul cromatografic se aplică proba (aproximativ 150—200 mg lipide totale) cu amestecul lipidic de separat, dizolvată în 5 ml cloroform. După ce proba a fost absorbită, se spală pereții coloanei cu 2 ml cloroform și se începe eluția cu o viteză de 3 ml/min cu următorii solvenți :

10 volume de coloană, cloroform ;
40 volume de coloană, acetonă ;
10 volume de coloană, cloroform ;

Fie se colectează fracții de cîte 10 ml, fie se colectează volumul total din fiecare solvent aplicat pe coloană. Fracțiile sînt analizate calitativ prin cromatografie în strat subțire.

Eluatele cu cloroform conțin lipide neutre (hidrocarburi, carotenoizi, clorofile, steroli liberi și esterificați, gliceroli, ceruri) și acizi grași.

Eluatele cu acetonă a lipidelor animale conțin cantități mari de glicolipide și puțină cardiolipină, din lipidele vegetale — cerebrozide, mono- și digalactozil diacilgliceroli, iar din lipidele streptococilor și micrococilor — glicozil diacilgliceroli și urme de fosfatide acide.

* Unisil (Clarkson Chemical Co.), Bio-Sil BH (Bio-Rad Laboratories), Adsorbosil-CAB (Applied Science Laboratories).

Eluatele cu metanol conțin cantități mari de fosfatide și urme de glicolipide.

Procedeul cromatografic poate fi utilizat și pentru cantități mai mari de lipide, respectînd raportul acid silicic—lipide de 75 : 1 și raportul înălțime coloană—secțiune transversală de 5 : 4.

Experiența 159. CROMATOGRAFIA LIPIDELOR PE COLOANE DE SEPHADEX

Cromatografia de partiție pe geluri de Sephadex nu este folosită curent în separarea lipidelor dintr-un amestec multicomponent deși permite îndepărtarea contaminanților solubili în apă și separarea gangliozidelor și acizilor biliari conjugați de alte componente hidrofobe.

Reactivi și solvenți

— Sephadex G—25 coarse ;

— solvent de eluție (i) : cloroform-metanol (19 : 1) saturat cu apă (aproximativ 5 ml la 1 litru amestec) ;

— solvent de eluție (ii) ; 850 ml amestec cloroform-metanol (19 : 1), 170 ml acid acetic glacial și 25 ml apă ;

— solvent de eluție (iii) : 580 ml cloroform-metanol (9 : 1), 170 ml acid acetic glacial și 42 ml apă ;

— solvent de eluție (iv) : metanol-apă (1 : 1).

Prepararea coloanei

Se suspendă pulbere de Sephadex în amestecul metanol-apă (1 : 1) și se îndepărtează particulele fine de gel, nesedimentabile prin sifonare sau decantare. După 3—4 ore de echilibrare, suspensia este turnată cu grijă într-o coloană cromatografică (1×30 cm), evitînd includerea bulelor de aer în stratul cromatografic care se formează prin sedimentarea gelului. La partea de sus a stratului cromatografic se aplică un strat de 2 cm înălțime din nisip curat. Se spală stratul cromatografic cu cîteva volume de metanol-apă (1 : 1) și imediat înaintea separării se spală cu solventul de eluție (i).

Modul de lucru

Se dizolvă proba (maximum 250 mg lipide totale) în 10 ml solvent de eluție (i) se aplică pe stratul cromatografic. Coloana este eluată cu o viteză de 0,5 ml/minut, aplicîndu-se următoarele volume de solvenți eluanți : 25 ml solvent (i), 50 ml solvent (ii), 25 ml solvent (iii) și 50 ml solvent de eluție.

Eluatele cu solventul (i) conțin toate lipidele neutre, acizii grași liberi, glicolipidele, fosfatidele, sărurile biliare (colat, deoxicolat), acizii biliari conjugați.

Cu solventul (ii) sînt eluate gangliozidele, sărurile biliare conjugate cu glicină, niște fosfatide acide degradate etc.

Solventul (iii) elueză urme de gangliozide, săruri biliare ale acidului dihidroxicolanic conjugate cu taurină, aminoacizi nepolari etc.

Solventul (iv) elueză taurocolatul, compuși nelipidici solubili în apă.

Cele patru eluate pot fi concentrate și supuse unei noi fracționări printr-o metodă cu o putere de rezoluție mai mare.

Experiența 160. CROMATOGRAFIEREA LIPIDELOR PE COLOANE DE DEAE-CELULOZĂ

Prin cromatografiere pe coloane umplute cu schimbători de ioni (DEAE- și TEAE-celuloză) se pot separa ușor lipidele neionice, lipidele cu structură amfiionică și cele acide, putîndu-se realiza fracționări mai avansate în cadrul acestor trei grupe, pe baza diferențelor de polaritate și de aciditate între componentele amestecurilor. DEAE-celuloza este utilizată pentru separarea generală a celor trei grupe de lipide dintr-un amestec complex.

Reactivi și solvenți

— DEAE-celuloză de cea mai înaltă capacitate de schimb. ionic ;
— soluție 1 N de HCl ;
— soluție 0,1 N de KOH ;
— acid acetic glacial ;
— colesterol ;
— solvent de eluție (i) : cloroform ;
— solvent de eluție (ii) : cloroform-metanol (9 : 1) ;
— solvent de eluție (iii) : cloroform-metanol (7 : 3) ;
— solvent de eluție (iv) : cloroform-metanol (1 : 1) ;
— solvent de eluție (v) : metanol ;
— solvent de eluție (vi) : cloroform-acid acetic (3 : 1) ;
— solvent de eluție (vii) : acid acetic ;
— solvent de eluție (viii) : metanol ;
— solvent de eluție (ix) : cloroform-metanol (4 : 1) care conține 0,05 M acetat de amoniu și diluat cu amoniac 28% (20 ml la 1 litru).

Modul de lucru

Prepararea schimbătorului : pentru a îndepărta impuritățile DEAE-celuloză se spală pe o pîlnie Büchner, sub sucțiune moderată, cu o soluție de HCl 1 N, cu apă pînă la pH neutru, cu o soluție de KOH 0,1 N și din nou cu apă pînă la pH neutru, ciclul fiind repetat de două ori. Pentru a transforma DEAE-celuloza din forma hidroxid în forma acetat, se spală schimbătorul cu acid acetic glacial redistilat, apoi cu metanol pentru a îndepărta acidul în exces. Se usucă schimbătorul în aer, apoi într-un exicator (peste granule de KOH) adaptat la vacuum, pînă la greutate constantă.

Prepararea coloanei : se suspendă 15 g de DEAE-celuloză în acid acetic glacial și se lasă peste noapte, la temperatura camerii. Se toarnă suspensia într-o coloană cromatografică cu un diametru de 2,5 cm, se lasă ca materialul cromatografic să sedimenteze (robinetul se ieșire trebuie să fie deschis !) și se obține un strat cromatografic cu o înălțime de 20 cm. Stratul este spălat cu 3 volume de coloană de metanol, 3 volume dintr-un amestec metanol-cloroform (1 : 1) și în final cu 3 volume de cloroform. Uniformitatea stratului cromatografic este testată prin cromatografierea unei soluții de 30 mg colesterol/10 ml cloroform, eluția realizîndu-se cu același solvent organic. Se colectează fracții de cîte 10 ml care-s analizate din punctul de vedere al prezenței colesterolului. Dacă acest compus

apare în eluatele 7—9, stratul cromatografic poate fi considerat omogen. Dacă colesterolul apare mult mai devreme sau mai tîrziu, coloana trebuie să fie reîmpachetată.

Eluția coloanei umplută cu DEAE-celuloză se face după aplicarea probei de analizat, care trebuie să conțină aproximativ 300 mg lipide totale în 10 ml cloroform, cu o viteză de 3 ml/min. În continuare vom prezenta schematic cantitățile din cei 9 solvenți de eluție care trebuie aplicate pe coloană, precum și componentele lipidice eluate.

Solvent de eluție	Volume de coloană	Lipide eluate
(i)	10	lipide neutre
(ii)	9	cerebrozide, lecitină, sfingomielină, lizolecitină, galactolipide
(iii)	9	unele ceramide, fosfatidil etanolamina
(iv)	9	unele ceramide, lizofosfatidil etanolamina
(v)	10	produși de oxidare necaracterizați, săruri
(vi)	10	aicizi grași, acizi biliari neconjugați sau conjugați cu glicină
(vii)	10	fosfatidil serina
(viii)	4	cardiolipina, acid fosfatidic, fasfatidil glicerol,
(ix)	10	fosfatidil inozitol, sulfolipide, sulfatide, săruri

Experiența 161. CROMATOGRAFIEREA LIPIDELOR PE COLOANE DE TEAE-CELULOZĂ

TEAE-celuloza este utilizată pentru separarea lipidelor care au ca unice grupări ionice, grupările carboxil (acizi grași, acizi biliari, gangliozide) și pentru separarea fosfatidil etanol aminei de ceramid polihexozizi.

Reactivi și solvenți

— TEAE-celuloză ;
— acid acetic glacial ;
— metanol ;
— soluție 0,1 N KOH în metanol ;
— amestec cloroform-metanol (1 : 1) ;
— solvent de eluție (i) : cloroform ;
— solvent de eluție (ii) : cloroform-metanol (1 : 1) ;
— solvent de eluție (iii) : cloroform-metanol (2 : 1) ;
— solvent de eluție (iv) : metanol ;
— solvent de eluție (v) : cloroform-metanol-acid acetic (2 : 1 : 0,03) ;
— solvent de eluție (vi) : acid acetic glacial ;
— solvent de eluție (vii) : metanol ;
— solvent de eluție (viii) : cloroform-metanol (4 : 1) care conține 0,05 M acetat de amoniu și diluat cu 20 ml/litru de amoniac 28% (proaspăt preparat) ;
— solvent de eluție (ix) : metanol.

Modul de lucru

Prepararea schimbătorului: se realizează similar ca în cazul DEAE-celulozei;

Prepararea coloanei: se suspendă 12 g TEAE-celuloză în acid acetic glacial și se lasă peste noapte. Se toarnă suspensia într-o coloană cromatografică cu un diametru de 2,5 cm, se lasă ca materialul cromatografic să sedimenteze și se obține un strat cromatografic cu o înălțime de 20 cm. Stratul cromatografic este spălat cu 3 volume de coloană de metanol pentru a îndepărta acidul acetic și apoi cu 4 volume dintr-o soluție metanolică de KOH 0,1 N pentru a transforma schimbătorul la forma hidroxil. Urmează apoi spălarea coloanei cu 6 volume de metanol, cu 4 volume dintr-un amestec cloroform-metanol (1 : 1) și în final cu 4 volume de cloroform.

Aplicarea probei și eluția. Pe stratul cromatografic se aplică o probă care conține 100—300 mg lipide totale în 10 ml cloroform. Eluția coloanei umplute cu TEAE-celuloză se face cu 9 solvenți de eluție, conform tabelului de mai jos:

Solvent de eluție	Volume de coloană	Lipidele eluate
(i)	5	colesterol, triacilgliceroli și alte lipide neutre
(ii)	8	cerebrozide, glicozil diacilgliceroli, lecitină, sfingomielină
(iii)	8	*ceramid polihexozizi*
(iv)	8	substanțe anorganice
(v)	6	fosfatidil etanolamină liberă și derivații ei N-metil și N, N-dimetil, acizi grași liberi, acizi biliari liberi și conjugați
(vi)	6	*fosfatidil serina*
(vii)	3	pentru a îndepărta acidul acetic
(viii)	8	acid fosfatidic, cardiolipina,
(ix)	6	fosfatidil glicerol, sulfatide, sulfolipide (la plante), fosfatidil inozitol și alte lipide acide

În acest experiment, fie se pot colecta eluate de cîte 10 ml fiecare, fie eluate totale ale fiecărui solvent aplicat pe coloană.

Experiența 162. CROMATOGRAFIA ÎN STRAT SUBȚIRE A LIPIDELOR

Cromatografia în strat subțire este una dintre cele mai simple și eficiente metode de separare a lipidelor din amestecuri, putîndu-se adapta și unor procedee de dozare a componentelor izolate. Principiile separării în straturi subțiri au fost descrise în Capitolul I, de aceea aici nu vom insista decît asupra particularităților separării și vizualizării lipidelor și părților lor componente.

În separarea lipidelor pot fi folosiți diferiți adsorbanți: acidul silicic, alumina, celuloza, Sephadex tip superfine, schimbătorii de bază de celuloză etc. În cazul unui adsorbant format prin impregnarea acidului silicic

cu azotatul de argint se poate realiza separarea lipidelor în funcție de numărul dublelor legături din structura lor. Unele firme producătoare de materiale cromatografice livrează hîrtii cromatografice impregnate cu acid silicic, care realizează o separare simplă, sensibilă și cu o mare putere de rezoluție.

Cromatografia în strat subțire permite o separare deosebit de rapidă și poate fi folosită și în scopuri preparative. În comparație cu cromatografia pe hîrtie, cromatografia pe straturi subțiri are o putere de rezoluție mult mai mare și asemenea primeia poate fi utilizată fie pentru o developare unidimensională, fie pentru una bidimensională.

Prepararea stratului : se realizează cu ajutorul unei suspensii formate din 50 g silicagel și 120 ml apă distilată, fie prin turnarea ei direct pe placă și nivelarea ulterioară a suprafeței stratului, fie cu ajutorul unui dispozitiv special de aplicare (v. experiența 7). Plăcile acoperite cu silicagel sînt uscate 1—2 ore la temperatura camerii, după care sînt activate la 110°C, prin incubare peste noapte. În scopuri analitice se realizează straturi de 0,25—0,5 mm grosime.

Pentru scopuri preparative este necesară purificarea absorbantului de orice substanță contaminată. Pentru aceasta se suspendă silicagelul în amestecul de solvenți metanol-cloroform (1 : 1), se filtrează suspensia pe o pîlnie Büchner, se usucă peste noapte la temperatura camerii și în final se usucă la 110°C. Se prepară o suspensie uniformă din 50 g silicagel și 115 ml soluție 0,01% de Na_2CO_3. Se prepară plăci cromatografice acoperite cu straturi de 0,7—1 mm grosime, care-s lăsate la temperatura camerii timp de o oră și activate la 120°C, 2 ore. Înaintea aplicării probei, aceste plăci trebuie supuse unei cromatografieri în gol, în solventul cloroform-metanol (1 : 1), pentru a îndepărta orice urme de lipide și apoi uscate în aer și la 120°C. Plăcile astfel prelucrate trebuie folosite imediat. Dacă sînt păstrate în laborator mai mult timp, înaintea utilizării trebuie reîncălzite timp de o oră la 120°C.

Pentru prepararea plăcilor impregnate în $AgNO_3$ se amestecă 47,5 g silicagel într-o soluție 2,5% $AgNO_3$ în apă. După omogenizarea perfectă, suspensia este turnată pe placă.

Aplicarea probei : se realizează prin aplicarea de spoturi cu ajutorul unor micropipete, în poziția de start. În scopuri analitice se aplică 0,5—2 μl dintr-o soluție cloroformică concentrată a lipidelor de separat (4—5%), adică 20—80 μg lipide per spot. În scopuri preparative se aplică 25—50 mg lipide. În cazul lipidelor care au un grad înalt de nesaturare, probele se aplică cu ajutorul unui capilar de plexiglas, sub azot. Imediat, după aplicarea probei trebuie realizată separarea cromatografică.

Sisteme solvent pentru developare. Diferite sisteme solvent developante sînt recomandate pentru diverse tipuri de lipide. Astfel, *pentru separarea hidrocarburilor* se recomandă fie numai benzenul, fie amestecul heptan-benzen (9 : 1). *Pentru separarea lipidelor neutre* sînt descrise în literatură mai multe sisteme developante, cu eficiențe similare :

(i) eter de petrol (60—70°C p.f.) — eter etilic — acid acetic (90 : 10 : 1)
(ii) heptan-eter etilic — metanol — acid acetic (90 : 20 : 2 : 3)
(iii) eter etilic—benzen etanol—acid acetic (40 : 50 : 2 : 0,2)

(iv) acetat de etil—metanol—apă (8 : 2 : 5) pentru plăci impregnate cu $AgNO_3$ în cazul separării prostaglandinelor și derivaților. *Pentru separarea fosfatidelor și glicolipidelor* se recomandă următoarele sisteme solvent developante :

(i) cloroform—metanol—apă (65 : 35 : 5)
(ii) cloroform—metanol—acid acetic—apă (25 : 15 : 4 : 2)
(iii) cloroform—metanol—acetonă—acid acetic—apă (40 : 25 : 3 : 7)

În cazul separării bidimensionale, migrarea în prima dimensiune poate fi realizată cu cloroform—metanol—apă (65 : 15 : 2), iar în a doua cu cloroform—metanol—acetonă—acid acetic—apă (65 : 10 : 20 : 10 : 3).

Evidențierea zonelor cromatografice separate : poate fi realizată cu *reactivi care colorează toate tipurile de lipide* sau cu *reactivi specifici* pentru anumite clase de lipide.

Următorii reactivi permit evidențierea tuturor lipidelor, reacția fiind soldată cu distrugerea substanței separate :

Reactiv A : acid sulfuric 40%, soluție preparată în apă ;

Reactiv B : acid sulfuric 55% (în greutate) ce conține 0,6% $K_2Cr_2O_7$;

Reactiv C : soluție apoasă 20% de $(NH_4)_2SO_4$.

Se pulverizează placa cromatografică developată cu una din soluțiile A, B sau C, apoi se incubează la 180°C timp de 30 minute. Toate substanțele organice (deci și lipidele) sînt vizualizate sub forma unor spoturi negre.

Alți reactivi sînt nedistructivi și pot fi utilizați pentru cantitativarea separării sau în scopuri preparative :

Reactiv D : se prepară o soluție stoc 0,12% de rhodamină 6 G, care poate fi păstrată indefinit, la întuneric. Imediat înaintea utilizării, se diluează de 100 ori soluția stoc. Cromatograma uscată se imersează în soluția diluată de rhodamină timp de 1—3 minute, apodi se spală cu apă distilată și se examinează în lumină ultravioletă. Fosfatidele acide dau spoturi fluorescente albastre, lipidele neutre și fosfatidele — galben, oranj, clorofilele și carotenoizii dau spoturi intense albastre sau roșii, lipidele care au suferit procese de peroxidare devin gri-albăstrui. Prin uscare, majoritatea lipidelor dau spoturi fluorescente galbene.

Reactiv E : cristalele de iod, la 60°C vaporizează iodul care este absorbit atît de lipidele nesaturate (mai intens) cît și de cele saturate. Plasarea cromatogramei într-un container saturat în vapori de iod, cîteva minute, conduce la apariția unor spoturi galben-maronii.

Reactiv F : se prepară o soluție 0,2% de 2',7'-diclorofluoresceină în etanol 95%. Pulverizarea cromatogramei cu această soluție, urmată de cercetarea ei în lumină ultravioletă (366 nm) permite detectarea lipidelor neutre ca spoturi galbene pe un fond colorat în roșu-purpuriu.

În continuare vom prezenta 11 *reactivi specifici de detectare* a unor clase de lipide.

Reactiv G : este utilizat pentru detectarea fosfatidelor. La 40 ml HCl conc. se adaugă 10 ml mercur și 80 ml dintr-o soluție *a* preparată prin

dizolvarea a 16 g molibdat de amoniu în 120 ml apă. Amestecul este omogenizat prin agitare timp de 30 minute și filtrat. Filtratul reprezintă soluția *b*. La ceea ce a rămas din soluția *a*, se adaugă 200 ml H_2SO_4 conc. și toată soluția *b*, se răcește și se aduce la un volum final de 1000 ml. Prin pulverizarea cromatogramei cu acest reactiv, după cîteva minute fosfatidele apar ca spoturi albastre pe un fond alb. Reactivul este specific și sensibil (detectează 10 μg) pentru fosfolipide.

Reactivul H: este utilizat pentru detectarea lipidelor care au o grupare amino liberă (fosfatidil etanolamnia, fosfatidil serina). Se dizolvă 0,25 g ninhidrină în 100 ml amestec acetonă-lutidină (9 : 1). Se pulverizează placa cromatografică cu acest reactiv, se usucă și se repulverizează. După 1—2 ore, de staționare la temperatura camerii, apar spoturi mov-purpurii corespunzătoare amino-lipidelor.

Reactivul I: este utilizat pentru detectarea colinei din lipidele care o conțin (lecitina, lizolectina și sfingomielina), dar nu este total specific deoarece reacționează cu un număr de lipide nesaturate. Se prepară soluția I prin dizolvarea a 1,7 g de azotat bazic de bismut în 100 ml acid acetic 20%, și soluția II prin dizolvarea a 10 g KI în 25 ml apă. Înainte de utilizare, se amestecă 20 ml soluție I cu 5 ml soluție II, se diluează cu 70 ml apă și se pulverizează cromatograma. Lipidele care conțin colină se colorează în oranj, în cîteva minute.

Reactivul J: este utilizat pentru identificarea glicolipidelor. Soluția I se prepară prin dizolvarea a 1 g metaperiodat de sodiu în 100 ml apă. Se prepară soluția II prin dizolvarea a 1 g de p-rozanilină clorhidrat în 100 ml apă și prin barbotarea unui curent de SO_2 pînă la decolorarea soluției (dacă persistă culoarea galbenă, soluția se tratează cu cărbune animal și se filtrează). Se pulverizează cromatograma cu soluție I (în mare exces) și se lasă 10 minute pentru oxidare. Se îndepărtează excesul de periodat prin pulverizare cu apă și se plasează cromatograma într-un tanc saturat cu vapori de SO_2 pînă culoarea galbenă a iodului eliberat dispare. Se pulverizează placa cu soluție II (reactiv Schiff). Imediat, apar spoturile colorate în roșu a fosfatidil glicerolului, urmează în timp să apară spoturile albastre ale glicozil diacilgliceroliIor, cerebrozidelor și altor glicolipide. Fosfatidil inozitolul apare colorat în galben.

Reactivul K: este utilizat pentru colorarea glicolipidelor. Se prepară o soluție de α-naftol 0,5% în amestec metanol-apă (1 : 1). Se pulverizează cromatograma, în abundență, cu soluția de α-naftol. Se usucă la temperatura camerii și apoi se pulverizează ușor cu o soluție de acid sulfuric (H_2SO_4—H_2O 95 : 5). După o incubare la 120°C, glicolipidele apar ca spoturi colorate în albastru-purpuriu, alte lipide polare se colorează în galben, iar colesterolul în roșu-gri.

Reactivul L: se prepară prin dizolvarea a 2 g rezorcinol în 100 ml apă. La cel puțin 4 ore înaintea folosirii, 10 ml din această soluție se adaugă la 80 ml HCl conc. ce conține 0,5 ml soluție 0,1 M de sulfat de cupru. Amestecul se diluează la un volum final de 100 ml cu apă distilată. Se pulverizează placa cromatografică cu acest reactiv, se acoperă cu o placă de sticlă și se încălzește la 120°C. Gangliozidele sau derivații acidului siliac apar ca spoturi albastre-violet.

Reactivul M : constă dintr-un amestec 1 : 1 din acid sulfuric conc. și acid acetic glacial. Se pulverizează placa cromatografică cu acest reactiv și se încălzește la 90°C timp de 15 min. Colesterolul și esterii lui apar ca spoturi roșii pe un fond alb. Lipidele nesaturate dau spoturi slab colorate în roz-maroniu.

Reactivul N : se obține prin dizolvarea a 50 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ în 90 ml apă, apoi se adaugă 5 ml acid acetic glacial și 5 ml acid sulfuric conc. Se pulverizează placa cromatografică cu acest reactiv și se încălzește la 100°C. Colesterolul apare ca un spot colorat roșu-violet în primele 2—3 minute, mai tîrziu apar spoturile violete ale esterilor colesterolului. La o încălzire prelungită apar și alte lipide.

Testul nesaturării : se plasează placa cromatografică într-un vas închis etanș, în prezența vaporilor de OsO_4. Dppă 15 minute, lipidele nesaturate sînt vizualizate ca niște spoturi negre.

Reactivul P : este utilizat pentru colorarea esterilor. Se prepară soluția I prin amestecarea a 100 ml soluție de clorhidrat de hidroxilamină (10 g $NH_2OH \cdot HCl$ în 25 ml apă, se diluează la 100 ml cu etanol) cu 200 ml soluție de hidroxid de sodiu (24 g NaOH în 25 ml apă, se diluează la 200 ml cu etanol), după centrifugare se folosește supernatantul. Soluția II se prepară prin mojararea a 10 g $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ cu 20 ml HCl, iar prin agitare se adaugă 300 ml eter etilic. Se pulverizează placa cromatografică cu soluția I, se usucă rapid și apoi se pulverizează cu II. Esterii apar ca spoturi roșii pe un fond galben.

Reactivul R : se prepară prin dizolvarea a 0,04 g verde de bromcrezol în 100 ml etanol și se adaugă NaOH 0,1 N pînă la apariția unei colorații albastre. Dacă cromatograma a fost developată cu un solvent care conținea acid acetic, se încălzește o oră de 120°C pentru a îndepărta urmele de acid. După pulverizare cu reactivul R, acizii grași apar ca niște spoturi albastre pe un fond galben.

Experiența 163. PREPARAREA COLESTEROLULUI DIN CREIER

Metoda de izolare a acestui sterol se bazează pe proprietatea lui de-a fi ușor solubil în acetonă, în timp ce lipidele complexe sînt insolubile.

Materiale și solvenți

— creier ;
— acetonă ;
— etanol.

Modul de lucru

Se omogenizează 100 g creier suspendat în 400 ml acetonă cu ajutorul unui omogenizator cu cuțite. Pentru a favoriza extracția, se agită suspensia timp de 10 minute, după care se filtrează pe o pîlnie Büchner. Rezidul este reluat în 200 ml acetonă, se omogenizează din nou și se filtrează. După combinarea filtratelor, extractul este concentrat prin distilare sub presiune redusă. Se răcește vasul sub jet de apă, iar colesterolul brut se izolează prin filtrare pe o pîlnie Büchner.

Se dizolvă colesterolul brut într-un volum minim de etanol fierbinte și se filtrează soluția fierbinte. Vasul în care se colectează filtratul este și el plasat pe o baie de apă fierbinte.

Se usucă în aer colesterolul. Se calculează randamentul procedeului de izolare al colesterolului din creier și punctul de topire al produsului obținut.

Experiența 164. PREPARAREA LECITINEI DIN OU

Majoritatea procedeelor de purificare a lecitinei din diverse surse biologice se bazează pe proprietatea ei de a precipita dintr-o soluție de etanol ca o sare de cadmiu.

Materiale, soluții și solvenți

— 12 ouă
— acetonă
— etanol 95%, 80%, 30%
— soluție 50% de $CdCl_2$
— cloroform
— eter de petrol
— etanol 80% saturat cu eter de petrol ce conține 0,1% $CdCl_2$
— eter etilic

Modul de lucru

Gălbenușurile de la 12 ouă sînt omogenizate cu 200 ml acetonă. La omogenat se adaugă încă 400 ml acetonă și se agită energic. Precipitatul de lecitină este separat prin filtrare și supus la cinci extracții succesive, cu cîte 200 ml acetonă. Precipitatul este dizolvat în 800 ml etanol 95%, prin agitare energică timp de 30 minute și extractul obținut este filtrat pe o pîlnie Büchner. În exractul etanolic se adaugă 15 ml soluție 50% de $CdCl_2$, care pecipită lecitină. După perfectarea precipitării (prin staționare o oră la 4°C), precipitatul este izolat prin filtrare pe o pîlnie Büchner și apoi spălat direct pe filtru cu acetonă.

Pentru purificarea lecitinei, precipitatul este dizolvat în 100 ml cloroform. Soluția este turnată, sub agitare constantă în 700 ml etanol 95% ce conține 10 ml soluție de clorură de cadmiu. După agitare timp de 10 minute la temperatura camerei, precipitatul este separat prin filtrare, redizolvat în cloroform și tratat cu etanol-$CdCl_2$ ca mai înainte. Precipitarea este perfectată prin agitare intermitentă timp de 30 minute. Operațiile se repetă și a treia oară.

Sarea de cadmiu a lecitinei este dizolvată în 150 ml eter de petrol, apoi se adaugă 500 ml etanol 80% saturat cu eter de petrol, ce conține 0,1% $CdCl_2$. Amestecul este plasat într-o pîlnie separatoare și agitat energic. Se separă două straturi, cel etanolic este îndepărtat, iar stratul eterului de petrol este supus la două noi extracții cu aceeași soluție de etanol 80% saturată în eter de petrol, ce conține 0,1% $CdCl_2$.

Extractele etanolice combinate sînt concentrate aproximativ la 2/3 din volumul inițial, după care este lăsat la —5°C peste noapte și apoi filtrat pe o pîlnie Büchner.

Precipitatul lecitină-$CdCl_2$ este redizolvat în 150 ml cloroform, iar la această soluție se adaugă 150 ml etanol 30% și se agită energic timp de

5 minute. În urma acestui tratament sarea de cadmiu a lecitinei disociază, iar $CdCl_2$ este spălat cu soluția de etanol 30%. Se îndepărtează stratul etanolic, iar la soluția cloroformică se adaugă din nou un volum egal de etanol 30%. Extracția $CdCl_2$ este repetată de încă trei ori, pentru îndepărtarea completă a clorurii de cadmiu.

Purificarea finală a lecitinei se realizează prin uscarea soluției cloroformice prin distilarea în vid a solventului. Lecitina este dizolvată în 100 ml eter etilic anhidru și la această soluție se adaugă 20 ml acetonă. Amestecul este lăsat peste noapte la 4°C, precipitatul format este îndepărtat prin filtrare pe o pîlnie Büchner ,iar filtratul clar este evaporat la sec, în vid. Lecitina este redizolvată în etanol absolut.

Se obțin 7 grame de lecitină pură.

8.7. STUDIUL UNOR PROPRIETĂȚI A MEMBRANELOR BIOLOGICE

Membranele biologice sînt constituite din mai multe straturi monomoleculare, cu o grosime de 60—100Å, avînd în structura lor lipide și proteine care sînt ținute asamblat prin interacții necovalente, care au caracter cooperativ. Lipidele membranare au o structură amfipatică, conținînd atît o parte hidrofilă, cît și o parte hidrofobă, formînd în mediu apos în mod spontan straturi bimoleculare, care constituie o barieră de permeabilitate în calea trecerii moleculelor polare. Proteinele din membrană au funcții distincte, de pompe, receptori, transductori de energie, enzime, translocaze etc.

Experiența 165. STUDIUL PERMEABILITĂȚII UNUI STRAT MONOMOLECULAR LIPIDIC

Compoziția în lipide a unei membrane biologice are un efect considerabil asupra permeabilității ei. Studiul acestui efect este realizat pe sisteme model constituite dintr-un strat monomolecular. Într-un sistem bifazic, butanol—apă, moleculele de lipide vor migra la interfața dintre cele două straturi, orientîndu-și partea polară spre stratul apos superior și partea hidrofobă spre faza organică. În acest experiment este urmărită comportarea unui colorant, albastru de metilen, față de acest sistem model. Spre deosebire de membranele biologice, acest model nu conține în structura lui proteinele, deci permite numai obținerea de informații privind difuzia pasivă a diferitelor biomolecule.

Reactivi și soluții

— acizi grași (acid stearic, acid palmitic, acid oleic)
— triacilgliceroli (trioleină, tripalmitină, tristearină)
— fosfolipide (lecitina din ou)
— colesterol
— butanol
— 25 mg% soluție de albastru de metilen, în butanol

Modul de lucru

În 7 eprubete termorezistente se pipetează cîte 5 ml apă. În fiecare eprubetă se pipetează cu grije, prin prelingere pe peretele de sticlă 5 ml butanol care conține albastru de metilen și 200 mg lipide. Se lasă eprubetele să stea o oră la temperatura camerei și se compară rezultatele obținute cu cele ale unui experiment martor care nu conține nici un lipid.

O cantitativare a eficacității diferitelor lipide testate ca bariere de permeabilitate poate fi realizată prin măsurarea extincției albastrului de metilen din faza apoasă.

Experiența 166. EFECTUL DETERGENȚILOR ASUPRA MEMBRANELOR ERITROCITARE

Detergenții dezintegrează structurile prin dizolvarea componentelor fosfolipidice. În cazul eritrocitelor, acțiunea detergenților poate fi urmărită colorimetric, prin măsurarea absorbției hemoglobinei eliberate din celulele dezintegrate.

Materiale și soluții

— sînge de șobolan proaspăt colectat sau sînge de om pentru transfuzii, cu termenul expirat ;

— soluție izotonică de NaCl 0,9%

— soluții 1% de dtergenți neutri (Triton X—100), anionici (dodecilsulfat de sodiu) și anionici (bromură de cetiltrimetil amoniu)

Modul de lucru

Se colectează sînge într-o eprubetă care conține 0, 5ml anticoagulant (citrat trisodic, soluție 4%). Celulele sanguine se izolează prin centrifugare, se spală de două ori cu soluția izotonică de NaCl 0,9% și se resuspendă în același volum de soluție ca sîngele original.

Se diluează suspensia eritrocitară cu soluția salină, astfel încît 0,5 ml din soluția diluată să dea cu 4,5 ml Triton X—100, la 540 nm, după centrifugare, o extincție de 0,8—0,9. Valoarea citită este considerată 100% liză, iar toate valorile obținute experimental vor fi reprezentate ca procente de liză.

În mai multe eprubete de centrifugă se pipetează cîte 0,5 ml din suspensia de eritrocite dluată, și apoi cîte 4,5 ml soluție salină. Se adaugă 0,05 ml din soluțiile de detergenți care urmează a fi testate, se amestecă ușor, se incubează la 37°C timp de 20 minute și se centrifughează. Celulele nedistruse se separă în sediment, iar în supernatant se măsoară absorbția la 540 nm.

Se examinează un domeniu de concentrații a celor trei detergenți și se realizează un grafic % hemoliză în funcție de concentrația agentului tensioactiv.

În final se examinează efectul protoector al hidrocortizonului prin incubarea eritrocitelor cu acest steroid înaintea expunerii la acțiunea detergentului.

CAPITOLUL IX

METODE DE DETERMINARE A pH ȘI PREPARAREA SOLUȚIILOR TOMPON

Concepția modernă despre acizi și baze a fost dezvoltată de Brönsted, Lewis și alții, care au definit acizii ca donori de protoni și bazele ca acceptori de protoni. Fiecare acid, are deci o bază conjugată lui :

$$\text{Acid} \rightleftharpoons \text{Bază} + H^+$$

sau în exemplele concrete :

acid		*bază conjugată*
HCl	$\longrightarrow$	$H^+ + Cl^-$
CH_3COOH	$\rightleftharpoons$	$H^+ + CH_3COO^-$
NH_4^+	$\rightleftharpoons$	$H^+ + NH_3$
H_2CO_3	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HCO_3^-$
H_2O	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HO^-$
H_3O^+	$\rightleftharpoons$	$H^+ + H_2O$

Unele specii ionice pot acționa ca baze cît și ca acizi și poartă denumirea de *amfoliți* sau *substanțe amfotere.*

Acizii și bazele puternice sînt complet izolate în soluție astfel încît concentrația în H^+ și HO^- liberi este aceeași cu concentrația acidului și respectiv a bazei :

$$HNO_3 \longrightarrow H^+ + NO_3^-$$
$$NaOH \longrightarrow Na^+ + HO^-$$

Acizii și bazele slabe disociază într-un grad limitat și concentrațiile speciilor ionice libere H^+ și OH^- depind de valoarea constantelor de disociere :

$$HCOOH \rightleftharpoons H^+ + HCOO^-$$
$$C_6H_5NH_2 + H^+ \rightleftharpoons C_6H_5NH_3^+$$

Capacitatea solventului de a se combina cu H^+ afectează tăria unui acid sau a unei baze astfel încît un compus poate acționa ca un acid slab într-un solvent și ca un acid puternic într-alt solvent. Acidul acetic,

de exemplu, este un acid slab într-un mediu apos și un acid puternic în amoniac lichid — datorită ușurinței cu care solventul se combină cu protonii. Tăria unui acid depinde, de asemenea, de tăria bazei conjugate ca și de constanta dielectrică a mediului.

În sistemele biologice, reacțiile au loc în medii apoase iar tăria unui acid trebuie consderată în raport cu apa ,ca unic solvent.

Deoarece concentrația în ioni de hidrogen a multor soluții este extrem de scăzută, Sörensen introduce termenul de pH — ca logaritmul negativ al activității ionilor de hidrogen :

$$pH = -\log a_{H^+}$$

Pentru soluții diluate, activitățile sînt practic egale cu termenii de concentrație, iar pH devine :

$$pH = -\log (H^+)$$

De exemplu, sîngele uman are o concentrație în ioni de hidrogen de 0,000 000 025 moli/l, care corespunde unui pH de 7,4 ;

$$(H^+)_{plasmei} = 0{,}000\ 000\ 025 = 2{,}5 \times 10^{-7}\ M$$

$$pH_{plasmei} = -\log (2{,}5 \times 10^{-7}) = 7{,}4$$

Ionii de hidrogen și ionii hidroxil rezultă din disocierea apei :

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + HO^-$$

a cărei constantă este :

$$K = \frac{(H^+)\,(HO^-)}{(H_2O)}$$

Concentrația apei poate fi considerată constantă și se poate defini *produsul ionic al apei :*

$$K_{H_2O} = (H^+)\,(HO^-)$$

care la 25°C este egal cu 10^{-14}, astfel că pH apei pure este egal cu 7.

$$(H^+) = (HO^-) = 10^{-7}$$

$$pH = -\log (H^+) = 7$$

La temperaturi diferite de 25°C pH de neutralitate este diferit de 7. Astfel la 0°C pH neutralității este 7,97 iar la 40°C este 6,77. Chiar creșterea temperaturii de la 37°C la 40°C cauzează o scădere a valorii pH cu 8%.

Valoarea pH este determinată cel mai corect cu ajutorul pH-metrelor care măsoară forța electromotoare a unei celule formată dintr-un *electrod de referință,* soluția de testat și un *electrod de sticlă* sensibil la ionii de hidrogen (Figura 6.1).

Electrodul de sticlă constă dintr-o bulă de sticlă foarte subțire (Figura 6.2), de aproximativ 0,1 mm grosime suflată dintr-un tub de sticlă tare de mare rezistență. În interiorul bulei se află o soluție de

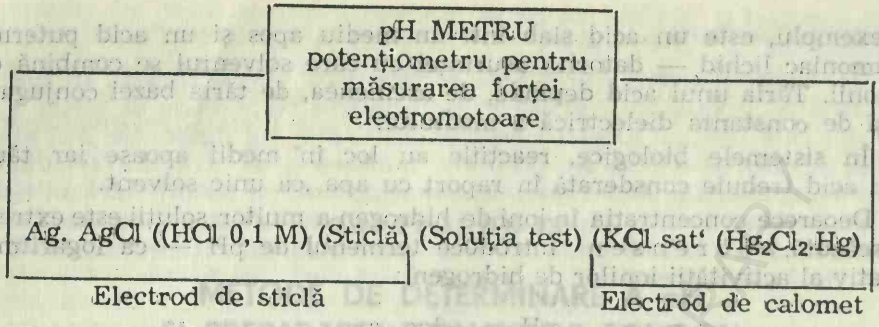


Figura 6.1. — Celula voltaică formată pentru măsurarea pH.

HCl 0,1 N și un fir de platină conectată prin intermediul unui electrod de Ag. AgCl, care este reversibil la ionii de H^+. Apare un potențial pe membrană subțire de sticlă care depinde de pH soluției în care este imersat electrodul. Acest potențial nu este afectat de săruri, proteine, agenți redox, astfel că electrodul poate fi utilizat pentru o mare varietate de medii.

Electrodul de sticlă imersat în soluția de testat reprezintă o jumătate din celula voltaică și circuitul trebuie completat cu un electrod de referință care nu este sensibil la ionii de hidrogen.

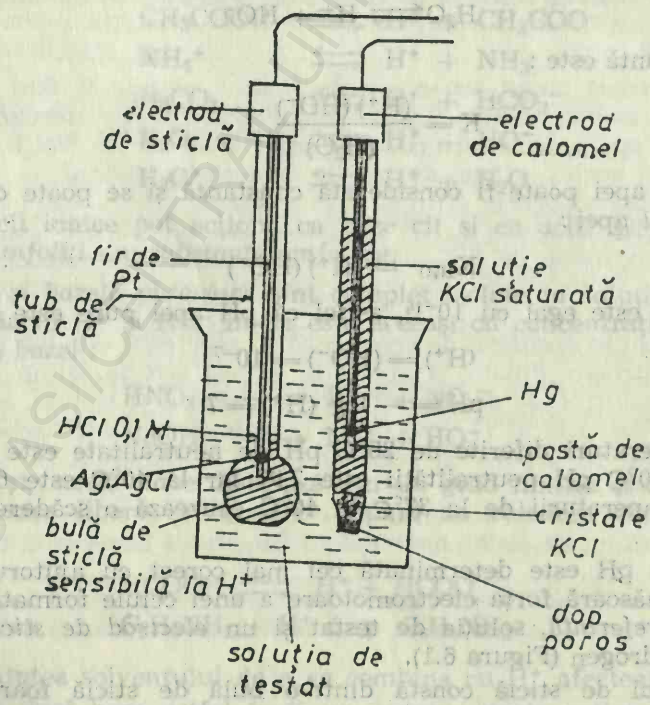


Figura 6.2. — Sistem electrod pentru măsurarea pH.

Cel mai mult folosit electrod de referință este *electrodul de calomel*, care nu este sensibil la ioni de H^+, este stabil și prezintă un potențial cunoscut în raport cu electrodul de hidrogen standard.

Forța electromotoare a celulei voltaice complete (E) formată prin legarea acestor doi electrozi este deci :

$$E = E_{ref} - E_{sticla}$$

unde E_{ref} este potențialul electrodului de referință (calomel) care la temperatura camerei este + 0,250 V și E_{sticla} este potențialul electrodului de sticlă care depinde de pH soluției de testat (pH_x).

$$E_{sticla} = 0{,}342 - 0{,}458\ pH_x$$

$$E = 0{,}250 - (0{,}342 - 0{,}058 pH_x) = -0{,}092 + 0{,}058\ pH_x$$

Electrodul de sticlă are o rezistență foarte înaltă ($10^6 - 10^8 \Omega$) astfel este necesar un potențiometru de înaltă impedanță.

Unele pH metre au electrozii de sticlă și electrozii de referință înglobați în aceeași entitate a aparatului.

Tampon HCl — KCl

Soluții stoc : *A* — KCl 0,2 M (14,91 g în 1 000 ml)
B — HCl 0,2 M
50 ml soluții A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	*x*	pH
97,0	1,0	20,6	1,7
78,0	1,1	16,6	1,8
64,5	1,2	13,2	1,9
51,0	1,3	10,6	2,0
41,5	1,4	8,4	2,1
33,3	1,5	6,7	2,2
26,3	1,6		

Tampon Glicocol — HCl

Soluții stoc : *A* — glicocol 0,2 M (15,1 g în 1 000 ml)
B — HCl 0,2 M
50 ml soluții A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	*x*	pH
5,0	3,6	16,8	2,8
6,4	3,4	24,2	2,6
8,2	3,2	32,4	2,4
11,4	3,0	44,0	2,2

Tampon ftalat — HCl

Soluții stoc : *A* — ftalat acid de potasiu 0,2 M (40,84 g în 1 000 ml)
B — HCl 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	*x*	pH
46,7	2,2	14,7	3,2
39,6	2,4	9,9	3,4
33,0	2,6	6,0	3,6
26,4	2,8	2,63	3,8
20,3	3,0		

Tampon aconitat — HCl

Soluții stoc : *A* — acid aconitic 0,5 M (87,05 g în 1 000 ml)
B — NaOH 0,2 M
20 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	*x*	pH
15,0	2,5	83,0	4,3
21,0	2,7	90,0	4,5
28,0	2,9	97,0	4,7
36,0	3,1	103,0	4,9
44,0	3,3	108,0	5,1
52,0	3,5	113,0	5,3
60,0	3,7	119,0	5,5
68,0	3,9	126,0	5,7
76,0	4,1		

Tampon acid citric — citrat de sodiu *

Soluții stoc : *A* — acid citric 0,1 M (21,01 g în 1 000 ml)
B — citrat de sodiu 0,1 M (29,41 g citrat. 2 H_2O în 1 000 ml) *x* ml soluție A + *y* ml soluție B, se aduce la 100 ml cu apă distilată

x	*y*	pH	*x*	*y*	pH
46,5	3,5	3,0	23,0	27,0	4,8
43,7	6,3	3,2	20,5	29,5	5,0
40,0	10,0	3,4	18,0	32,0	5,2
37,0	13,0	3,6	16,0	34,0	5,4
35,0	15,0	3,8	13,7	36,3	5,6
33,0	17,0	4,0	11,8	38,2	5,8
31,5	18,5	4,2	9,5	41,5	6,0
28,0	22,0	4,4	7,2	42,8	6,2
25,5	24,5	4,6			

* nu se recomandă utilizarea citratului de sodiu. 5 1/2 H_2O.

Tampon acid acetic — acetat

Soluții stoc : *A* — acid acetic 0,2 M (11,55 ml în 1 000 ml)
B — acetat de sodiu 0,2 M (16,4 g sare anh. sau 27,2 g sare. 3 H_2O la 1 000 ml
x ml soluție A + *y* ml soluție B, se aduce la 100 ml cu apă distilată

x	*y*	pH
46,3	3,7	3,6
44,0	6,0	3,8
41,0	9,0	4,0
36,8	13,2	4.2
30,5	19.5	4,4
25,5	24,5	4,6
20,2	30,0	4,8
14,8	35,2	5,0
10,5	39,5	5,2
8,8	41,2	5,4
4,8	45,2	5,6

Tampon acid citric — Na_2HPO_4

Soluții stoc : *A* — acid citric 0,1 M (19,21 g în 1 000 ml)
B — Na_2HPO_4 0,2 M (53,65 g $Na_2HPO_4 \cdot 7\,H_2O$ sau 71,7 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ în 1 000 ml)
x ml soluție A + *y* ml soluție B, se aduce la 100 ml cu apă distilată

x	*y*	pH	*x*	*y*	pH
44,6	5,4	2,6	24,3	25,7	5,0
42,2	7,8	2,8	23,3	26,7	5,2
39,8	10,2	3,0	22,2	27,8	5,4
37,7	12,3	3,2	21,0	29,0	5,6
35,9	14,1	3,4	19,7	30,3	5,8
33,9	16,1	3,6	17,9	32,1	6,0
32,3	17,7	3,8	16,9	33,1	6,2
30,7	19,3	4,0	15,4	34,6	6,4
29,4	20,6	4,2	13,6	36,4	6,6
27,8	22,2	4,4	9,1	40,9	6,8
26,7	23,3	4,6	6,5	43,6	7,0
25,2	24,8	4,8			

Tampon acid succinic — NaOH

Soluții stoc : *A* — acid succinic 0,2 M (23,6 g în 1 000 ml)
B — NaOH 0,2 M
25 ml soluție A + *x* ml soluție B, se aduce la 100 ml cu apă distilată

x	pH	*x*	pH
7,5	3,8	26,7	5,0
10,0	4,0	30,3	5,2
13,3	4.2	34,2	5,4
16,7	4,4	37,5	5,6
20,0	4,6	40,7	5,8
23,5	4,8	43,5	6,0

Tampon ftalat — NaOH

Soluții stoc : *A* — ftalat acid de potasiu 0,2 M (40,84 g în 100 ml)
B — NaOH 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH
3,7	4,2
7,5	4,4
12,2	4,6
17,7	4,8
23,9	5,0
30,0	5,2
35,5	5,4
39,8	5,6
43,0	5,8
45,5	6,0

Tampon maleat de sodiu — NaOH

Soluții stoc : *A* — maleat acid de sodiu 0,2 M (8 g NaOH + 23,2 g acid maleic sau 19,6 g anhidrină maleică în 1 000 ml
B — NaOH 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH
7,2	5,2
10,5	5,4
15,3	5,6
20,8	5,8
26,9	6,0
33,0	6,2
38,0	6,4
41,6	6,6
44,4	6,8

Tampon cacodilat de sodiu HCl

Soluții stoc : *A* — cacodilat de sodiu 0,2 M (42,8 g sare · $3H_2O$ în 1000 ml)
B — HCl 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	x	pH
2,7	7,4	29,6	6,0
4,2	7,2	34,8	5,8
6,3	7,0	39,2	5,6
9,3	6,8	43,0	5,4
13,3	6,6	45,0	5,2
18,3	6,4	47,0	5,0
23,8	6,2		

Tampon Na_2HPO_4 — NaH_2PO_4

Soluții stoc : *A* — soluție NaH_2PO_4 0,2 M (27,8 g în 1 000 ml)
B — soluție Na_2HPO_4 0,2 M (53,65 g $Na_2HPO_4 \cdot 7\,H_2O$ sau 71,7 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ în 1 000 ml)
x ml soluție A + y ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	y	pH	x	y	pH
93,5	6,5	5,7	45,0	55,0	6,9
92,0	8,0	5,8	39,0	61,0	7,0
90,0	10,0	5,9	33,0	67,0	7,1
87,7	12,3	6,0	28,0	72,0	7,2
85,0	15,0	6,1	23,0	77,0	7,3
81,5	18,5	6,2	19,0	81,0	7,4
77,5	22,5	6,3	16,0	84,0	7,5
73,5	26,5	6,4	13,0	87,00	7,6
68,5	31,5	6,5	10,5	90,5	7,7
62,5	37,5	6,6	8,5	91,5	7,8
56,5	43,5	6,7	7,0	93,0	7,9
51,0	49,0	6,8	5,3	94,7	8,0

Tampon Tris-maleat

Soluții stoc : *A* — soluție Tris-acid maleic 0,2 M (24,2 g tris (hidroximetil) aminometan + 23,2 g acid maleic sau 19,6 g anhidridă maleică în 1 000 ml)
B — NaOH 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la 200 ml cu apă distilată

x	pH	x	pH
7,0	5,2	48,0	7,0
10,8	5,4	51,0	7,2
15,5	5,6	54,0	7,4
20,5	5,8	58,0	7,6
26,0	6,0	63,5	7,8
31,5	6,2	69,0	8,0
37,0	6,4	75,0	8,2
42,5	6,6	81,0	8,4
45,0	6,8	86,5	8,6

Tampon veronal HCl

Soluții stoc : *A* — barbital sodic 0,2 M (41,2 g în 1 000 ml)
B — HCl 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la un volum final de 200 ml

x	pH	x	pH
1,5	9,2	22,5	7,8
2,5	9,0	27,5	7,6
4,0	8,8	32,5	7,4
6,0	8,6	39,0	7,2
9,0	8,4	43,0	7,0
12,7	8,2	45,0	6,8
17,5	8,0		

Tampon Tris HCl

Soluții stoc : *A* — Tris (hidroximetil) aminometan 0,2 M (24,2 g în 1 000 ml)

B — HCl 0,2 M

50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la un volum final de 200 ml

x	pH
5,0	9,0
8,1	8,8
12,2	8,6
16,5	8,4
21,9	8,2
26,8	8,0
32,5	7,8
38,4	7,6
41,4	7,4
44,2	7,2

Tampon acid boric — birax

Soluții stoc : *A* — acid boric 0,2 M (12,4 g la 1 000 ml)

B — borax 0,05 M (19,05 în 1 000 ml)

50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la un volum final de 200 ml

x	pH	x	pH
2,0	7,6	22,5	8,7
3,1	7,8	30,0	8,8
4,9	8,0	42,5	8,9
7,3	8,2	59,0	9,0
11,5	8,4	83,0	9,1
17,5	8,6	115,0	9,2

Tampon glicocol — NaOH

Soluții stoc : *A* — glicocol 0,2 M (15,01 g la 1 000 ml)

B — NaOH 0,2 M

50 ml soluție A + x ml soluție B, se aduce la un volum final de 200 ml

x	pH
4,0	8,6
6,0	8,8
8,8	9,0
12,0	9,2
16,8	9,4
22,4	9,6
27,2	9,8
32,0	10,0
38,6	10,4
45,5	10,6

Tampon borax — NaOH

Soluții stoc : *A* — borax 0,05 M (19,05 g în 1 000 ml)
B — NaOH 0,2 M
50 ml soluție A + x ml soluție B, diluată la 200 ml

x	pH
0,0	9,28
7,0	9,35
11,0	9,4
17,6	9,5
23,0	9,6
29,0	9,7
34,0	9,8
38,6	9,9
43,0	10,0
46,0	10,1

Tampon carbonat — bicarbonat

Soluții stoc : *A* — Na_2CO_3 0,2 M (21,2 g în 1 000 ml)
B — $NaHCO_3$ 0,2 M (16,8 g în 1 000 ml)
x ml soluție A + y ml soluție B, se aduce la 200 ml

x	y	pH	x	y	pH
4,0	46,0	9,2	27,5	22,5	10,0
7,5	42,5	9,3	30,0	20,0	10,1
9,5	40,5	9,4	33,0	17,0	10,2
13,0	37,0	9,5	35,5	14,5	10,3
16,0	34,0	9,6	38,5	11,5	10,4
19,5	30,5	9,7	40,5	9,5	10,5
22,0	28,0	9,8	42,5	7,5	10,6
25,0	25,0	9,9	45,0	5,0	10,7

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Biblioteca Centrala Universitara
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche: Cump. 35. soluții
Prețul

BIBLIOGRAFIE

1. T. S. WORK, E. WORK (editori) — *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, volum 7, North-Holland, 1979.
2. S. P. COLOWICK și N. O. KAPLAN (editori) — *Methods in Enzymology*, volum 1, Academic Press, 1955.
3. I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU — *Enzime*, Editura Medicală, 1974.
4. D. T. PLUMMER — *An Introduction to Practical Biochemistry*, ediția a 2-a, McGraw-Hill Book Company, 1978.
5. V. GHEȚIE, V. MICUȘAN — *Analiza imunochimică*, Editura Academiei, 1966.
6. F. FRAI — *Practical Biochemistry— An Introductory Course* Butterworths University Park Press, 1972.
7. I. F. DUMITRU — *Lucrări practice de biochimie*, Editura Didactică și Pedagogică, 1967.
8. B. L. WILLIAMS, K. WILSON — *A biologists guide to Principles and Techniques of Pratical Biochemistry*, Edward Arnold Publ. Ltd., 1975.
9. L. B. DOTTI, J. M ORTEN — *Laboratory Instructions in Biochemistry*, ediția a 8-a, C. V. Mosby Company, 1971.
10. P. S. DIAMOND, R. F. DENMAN — *Laboratory Techniques in Chemistry and Biochemistry*, Butterworts, 1973.
11. A. HECHTLINGER — *Biochemistry Units for the High School Biology Teacher*, Jarker Publishing Co., 1973.
12. J. L. BAILEY — *Techniques in Protein Chemistry*, ediția a 2-a, Elsevier Publishing Co., 1967.
13. E. HEFTMAMNN — *Chromatography*, Reinhold Publishing Co., 1961.
14. J. B. SUMNER, G. F. SOMERS — *Chemistry and Methods of Enzymes*, Academic Press, 1953.
15. J. X. KHYM — *Analytical Ion Exchange Procedures in Chemistry and Biology*, Prentice-Hall, Biological Techniques Series, 1974.
16. L. FISCHER — *An Introduction to Gel Chromatography — Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (T. S. Work & E. Work editori), North-Holland, 1969.
17. J. CLAUSEN — *Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules — Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (T. S. Work & E. Work), North Holland, 1971.
18. E. A. PETERSON — *Cellulosic Ion Exchangers — Laboratory techniques in biochemistry and mloecular biology* (T. S. Work & E. Work, editori,) North-Holland, 1970.
19. A. H. GORDON — *Electrophoresis of Proteins in Polycrylamide and Starch — Laboratory techniques in biochemistry and moledular biology* (T. S. Work & E. Work, editori), North-Holland, 1969.

20. H. U. BERGMEYER (editor) — *Methods of Enzymatic Analysis*, volume I, II, III, IV, Academic Press, 1974.
21. * * * WORTHINGTON — *Enzymes and related biochemicals*, 1978.
22. * * * BIOCHEMICAL MERK, *Preparations for Biochemistry*, 1979.
23. T. DEVENYI, J. GERGELY — *Aminoacids, Peptides and Proteins*, Akademiai Kiado, Budapest, 1969.
24. A. K. SINHA, Anal. Biochem. *47*, 389, 1972.
25. R. F. BEERS jr., I. W. SIZER, J. Biol. Chem., 195, 133, 1952.
26. E. KUN, L. G. ABOOD, Science, *109*, 144, 1949.
27. B. ILLINGWORTH, G. T. CORI, *Biochemical Preparations*, *3*, i, 1953.
28. S. REITMAN, S. FRANKEL, Am. J. clin. Pathol., *28*, 56, 1956.
29. N. E. TONHAZY, N. E. WHITE, W. W. UMBREIT, Arch. Biochem, Biophys., *28*, 36, 1950.
30. I. F. DUMITRU, S. NICULESCU, D. IORDĂCHESCU, Enzymologia, *42*, 79, 1972.
31 V. MASSEY, B. CURTI, J. Biol. Chem., *242*, 1259, 1967.
32. C. H. W. HIRS, S. MOORE, W. H. STEIN, J. Biol. Chem., *200*; 493; 1953.
33. F. HOSTETTLER, E. BOREL, H. DEUEL, Helv. Chim. Acta, *34*, 2132, 1951.
34. M. CESKA, K. BIRATH, B. BROWN, Clin. Chim. Acta, 437, 445, 1969.
35 G. TABORSKY, J. Biol. Chem., *234*, 2652, 1959.
36. H. Mş KALCKAR, J. Biol. Chem., *167*, 461, 1947.
37. O. WARBURG, W. CHRISTIAN, Biochem. Z., *310*, 384, 1941.
38. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193, 165, 1951.
39. C. FISKE, Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem., *66*, 375, 1925.
40. D. DIXON, Biochem. J., *54*, 457, 1953.
41. P. MATAIS, J. BIETH, Ann. Biol. Clin., 26, 133, 1968.
42. R. R. BARTON, Anal. Biochem., *14*, 258, 1966.
43.NATALIA MITRICĂ-KONDI, Laboratorul clinic, Editura Medicală, 1981
44. O. NELSON, J. Biol. Chem., *153*, 375, 1944.
45. J. T. PARK, M. J. JOHNSON, J. Biol. Chem., *181*, 149, 1949.
46. Z. DISCHE, L B. SHETTLES, M. OSNES, Arch. Biochem., *22*, 169, 1949.
47. R. SHIELDS, W. BURNETT, Anal. Chem., *32*, 885, 1960.
48. J. H. ROE, J. H. EPSTEIN, N. P. GOLDSTEIN, N. P. GOLDSTEIN, J. Biol Chem., *178*, 839, 1949.
49. Z. DISCHE, E. BORENFREUND, J. Biol. Chem., *192*, 583, 1951.
50. W. DEICHMANN, J. Lab. Clin. Med., *28*, 770, 1943.
51. W. MEJBAUM, Z. physiol. Chem., *258*, 117, 1939.
52. Z. DISCHE, J. Biol. Chem., *183*, 489, 1950.
53. N. F. BOAS, J. Biol. Chem, *204*, 553, 1953.
54. H. U. BERGMEYER, Methods of Enzymatic Analysis, vol. 3, Acad. Press, 1974.
55. J. H. ROE, J. Biol., *178*, 839, 1949.
56. G. KELETI, W. H. LEDERER, Handbook of micromethods for the biological sciences, Von Nostrand Reinhold Co., 1979.
57. M. KATES, Techniques of Lipidology, Laboratory techniques, T. S. Work, E. Work, editori, North Holland, American Elsevier, 1975.

58. J. FOLCH, M. LEES, G. A. SLOANE-STANLEY, J. Biol. Chem., *226*, 497, 1957.
59. E. G. BLIGH, W. J.DYER, Can. J. Biochem. Physiol., *37*, 911, 1959.
60. M. KATES, Adv. Lipid Res., *8*, 225, 1970.
61. C. H. LEA, D. N. RHODES, Biochim. Biophys. Acta, *17*, 416, 1955.
62. C. H. LEA, D. N. RHODES, Biochim. Biophys. Acta, *17*, 416, 1955.
63. O. RENKONEN, Biochim. Biophys. Acta, *54*, 361, 1961.
64. M. DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, F. SMITH, Anal. Chem., *28*, 350, 1956.
65. N. ZOLLNER, K. KIRSCH, Z. ges. exp. Med., *135*, 545, 1962.

Dat la cules 10-04-1988. Bun de tipar 23-05-1988.
Coli tipografice 18. Tiraj 313
Tiparul s-a efectuat nub c-da nr. 15. Tipografia Universității din București

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 35,00